ESTUDIO FAO: ALIMENTACION Y NUTRICION 14/12

manuales para el control de calidad de los alimentos

12. la garantía de la calidad en el laboratorio microbiológico de control de los alimentos

ORGANIZACION DE LAS NACIONES UNIDAS PARA
LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION ROMA

ESTUDIO FAO: ALIMENTACION Y NUTRICION 14/12

manuales para el control de calidad de los alimentos

12. la garantía de la calidad en el laboratorio microbiológico de control de los alimentos

ORGANIZACION DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION
Roma, 1992

Las denominaciones empleadas en esta publicación y la forma en que aparecen presentados los datos que contiene no implican, de parte de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, juicio alguno sobre la condición jurídica de países, territorios, ciudades o zonas, o de sus autoridades, ni respecto de la delimitación de sus fronteras o límites.

M-90
ISBN 92-5-303053-4

Reservados todos los derechos. No se podrá reproducir ninguna parte de esta publicación, ni almacenarla en un sistema de recuperación de datos o transmitirla en cualquier forma o por cualquier procedimiento (electrónico, mecánico, fotocopia, etc.), sin autorización previa del titular de los derechos de autor. Las peticiones para obtener tal autorización, especificando la extensión de lo que se desea reproducir y el propósito que con ello se persigue, deberán enviarse al Director de Publicaciones, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Viale delle Terme di Caracalla, 00100 Roma, Italia.

© FAO 1992

PROLOGO

El control de la inocuidad y la calidad de los alimentos forma parte integrante de los programas nacionales de desarrollo. Los sistemas nacionales de control de los alimentos están destinados a proteger la salud y el bienestar de los consumidores, promover el comercio de los alimentos y los productos alimenticios y proteger los intereses de los productores, elaboradores o vendedores de alimentos honrados y cumplidores, contra la competencia deshonesta o desleal. Se da prioridad a la prevención de los riesgos químicos y biológicos derivados de la contaminación, la adulteración o un simple manejo inadecuado de los alimentos. Otro factor de importancia es el mantenimiento de un nivel general de calidad de los alimentos.

El servicio de análisis de laboratorio forma parte integrante de todo sistema nacional de control de los alimentos. El laboratorio típico de control de los alimentos dispone de servicios de análisis químicos y microbiológicos. Cada uno de estos sectores técnicos tiene diferentes necesidades y procedimientos para establecer y mantener un trabajo analítico de alta calidad.

El presente Manual es una guía práctica para el establecimiento de un programa de garantía de calidad (GC) en un laboratorio microbiológico de control de los alimentos. Su finalidad última consiste en garantizar que el laboratorio microbiológico produzca resultados analíticos fiables y de alta calidad, con una documentación continua que facilite un historial de los análisis claro, preciso e indiscutible, y cuyos diversos elementos estén todos armonizados entre sí. Se está preparando un manual análogo de GC para los laboratorios de química.

Este Manual está destinado al personal de administración y de análisis de los laboratorios de microbiología, pero las autoridades reglamentarias y otras personas interesadas podrán encontrar en él informaciones e ideas útiles acerca de los problemas inherentes a la creación y aplicación de un programa de garantía de calidad en un laboratorio microbiológico de control de los alimentos.

La FAO desea expresar su reconocimiento al Dr. Wallace Andrews, de la División de Microbiología, Food and Drug Administration (FDA), Washington, D.C. (Estados Unidos de América), que preparó el texto de este manual. Es de agradecer también la colaboración de otros miembros de la FDA, entre ellos la Sra. Lois Tomlison que se encargó de la edición técnica y la Sra. Donna Alesia Newman que mecanografió el borrador. parte del texto fue proporcionada por el Sr. Peter Martin, de "Lynn, Martin and Radford", Analistas Públicos, Reading, Berkshire (Reino Unido).

El borrador del manual fue revisado por el Dr. B. Amla, Director del Instituto Central de Investigación de la Tecnología de los Alimentos de Mysore (India), el Dr. T. Karki, Director del Laboratorio Central de Investigación de los Alimentos, Ministerio de Agricultura, Kathmandú (Nepal), el Dr. H. Leonhardt, Director de Cooperación Científica Internacional del Instituto Robert von Ostertag, Berlín (RFA), y el Dr. H. Mol, ex-Director del Servicio Nacional de Inspección de Alimentos, Utrecht (Países Bajos). La FAO les expresa a todos ellos su gratitud.

Esta publicación está a la disposición de particulares y organizaciones. Los comentarios o sugerencias sobre posibles ediciones futuras de esta publicación deben remitirse a la siguiente dirección:

Jefe del Servicio de Calidad y Normas Alimentarias
Dirección de Política Alimentaria y Nutrición
Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
Via delle Terme di Caracalla
00100 Roma, Italia

ADVERTENCIA

Los métodos y procedimientos de análisis descritos en este Manual deben ser aplicados por un personal calificado, y en un laboratorio debidamente equipado. Tales métodos requieren frecuentemente el empleo de sustancias peligrosas, como otros muchos métodos de laboratorio.

Para su ejecución correcta y sin peligros, es esencial que el personal de laboratorio se atenga a las normas de seguridad establecidas para el manejo de sustancias peligrosas.

Aunque para la preparación de estas informaciones se han tomado las máximas precauciones, la FAO advierte expresamente que no asume ninguna responsabilidad por cualquier clase de daños producidos o derivados de la aplicación de estos métodos o procedimientos.

Por lo demás, el hecho de figurar en el presente Manual no confiere a los procedimientos de garantía de la calidad la condición de procedimientos oficiales.

LA GARANTIA DE LA CALIDAD EN EL LABORATORIO MICROBIOLOGICO DE CONTROL DE LOS ALIMENTOS

INDICE

	Página
1. ADMINISTRACION	1
1.1 Objetivos del laboratorio	1
1.2 Definición de la garantía de la calidad y el control de calidad	2
1.3 Ventajas de un programa de garantía de la calidad	3
1.4 Definición de responsabilidades	4
Responsabilidades de la administración	4
Responsabilidades de la unidad de garantía de la calidad	7
Responsabilidades del analista	8
1.5 Referencias	9
2. EL PROGRAMA DE GARANTIA DE LA CALIDAD	10
2.1 Definición	10
2.2 Preparación	10
2.3 El manual de garantía de la calidad	12
2.4 Aplicación	13
2.5 Referencias	14
3. EL LABORATORIO	15
3.1 Diseño del laboratorio	15
Consideraciones generales	15
El laboratorio de microbiología	15
3.2 Vigilancia ambiental	18
Consideraciones generales	18
El laboratorio microbiológico	19
3.3 Servicios de limpieza y mantenimiento	20
3.4 Referencias	21

4. PERSONAL 22

4.1 Selección y cualificaciones 22
4.2 Capacitación 23
4.3 Rendimiento del personal 25
Consideraciones generales 25
Programas de verificación de muestras 25
4.4 Referencias 28

5. MUESTRAS 29

5.1 Responsabilidad de la muestra 29
5.2 Identificación e integridad 30
5.3 Muestreo para análisis 31
5.4 Almacenamiento y eliminación de las muestras 32
5.5 Embalaje y envío 33
5.6 Referencias 36

6. EQUIPO 37

6.1 Mantenimiento y reparación 37
Incubadoras 37
Baños maría 38
Refrigeradores y congeladores 38
Autoclaves 38
Hornos de aire caliente 40
Balanzas 40
Medidores de pH 40
Mezcladores 41
Campana de flujo laminar 41
Microscopios 42
Programa de mantenimiento y reparación 42
6.2 Calibración 43
Incubadoras 43
Baños maría 43
Refrigeradores y congeladores 44
Autoclaves 44
Hornos de aire caliente 44
Balanzas 45
Medidores de pH 45
Mezcladores 45
Campana de flujo laminar 46
Microscopios 46

6.3 Comprobaciones del rendimiento 46
Incubadoras 46
Baños maría 46
Refrigeradores y congeladores 47
Autoclaves 48
Hornos de aire caliente 48
Balanzas 48
Medidores de pH 48
Mezcladores 49
Campana de flujo laminar 49
Microscopios 50
6.4 Instrumental de vidrio 50
6.5 Referencias 52

7. PRODUCTOS QUIMICOS/MEDIOS/REACTIVOS 53

7.1 Especificaciones y pedidos 53
7.2 Preparación y empleo 54
7.3 Duración útil y condiciones de almacenamiento 56
7.4 Especificaciones del rendimiento 57
7.5 Referencias 61

8. ESTANDARES 62

8.1 Especificaciones y pedidos 62
8.2 Preparación y utilización 63
8.3 Duración útil y condiciones de almacenamiento 63
8.4 Especificaciones de rendimiento 63
Pureza 63
Morfología 64
Reacciones bioquímicas 64
Reacciones serológicas 65
8.5 Referencias 66

9. METODOLOGIA 67

9.1 Elección del método 67
9.2 Controles 69
Controles de muestreo 69
Controles analíticos positivos 69
Controles analíticos negativos 69
Controles de esterilidad del instrumental de vidrio 70
Controles de los cultivos en baño maría 70
9.3 Validación del método 70
9.4 Muestras de referencia 72
9.5 Referencias 73

10. ENSAYOS CON ANIMALES 74

10.1 Higiene personal 74
10.2 Pedidos y cuarentena 74
10.3 La habitación de los animales 74
10.4 Jaulas 75
10.5 Cuidados y alimentación 75
10.6 Selección para el ensayo 76
10.7 Como sujetar e inyectar a los ratones 76
10.8 Eliminación 76

11. DOCUMENTACION 77

11.1 Localización 77
11.2 Registros de recolección de muestras 78
11.3 Fichas de trabajo e informes de los analistas 81
11.4 Otros documentos 85

12. INSPECCIONES Y COMPROBACIONES DE LA GARANTIA DE CALIDAD 86

12.1 Comprobación de los trabajos en curso 86
12.2 Comprobaciones retrospectivas 87
12.3 Acreditación 88
12.4 Actividades de seguimiento 89
12.5 Referencias 90

ANEXOS

Anexo 1	Modelo de Manual de Garantía de la Calidad	91
Anexo 2	Vigilancia de superficies - Método de frotación	98
Anexo 3	Vigilancia de superficies - Método del contacto directo del agar con el organismo replicado (RODAC)	99
Anexo 4	Modelo de registro de responsabilidad de la muestra	100
Anexo 5	Modelo de precinto de la muestra	101
Anexo 6	Almacenamiento de muestras de alimentos	102
Anexo 7	Calibración del termómetro de inmersión parcial	109
Anexo 8	Calibración del microscopio	110
Anexo 9	Determinación de la eficacia bacterial de las lámparas ultravioletas	111
Anexo 10	Determinación de los residuos bacteriostáticos/ bactericidas en las superficies de vidrio del laboratorio	112
Anexo 11	Determinación de la idoneidad del agua para la preparación de medios y reactivos microbiológicos	113
Anexo 12	Conservación de cultivos microbiológicos de base	117
Anexo 13	Modelo de Certificado de Sanidad Animal	126
Anexo 14	Procedimiento para sujetar a los ratones y aplicarles una inyección intraperitoneal	127
Anexo 15	Procedimientos para provocar la muerte indolora a los ratones	128
Anexo 16	Modelo de organigrama de la presentación de muestras al laboratorio para su examen	129
Anexo 17	Modelo de informe de recolección	130
Anexo 18	Modelo de ficha de trabajo del analista	131
Anexo 19	Resumen de los resultados bacteriológicos	132
Anexo 20	Registro bacteriológico	134
Anexo 21	Registro de Salmonella	137
Anexo 22	Registro de Shigella	138
Anexo 23	Hoja complementaria para los alimentos enlatados	139
Anexo 24	Hoja complementaria para el botulismo	140
Anexo 25	Registro bacteriológico de mariscos	141
Anexo 26	Lista de cuestiones para la comprobación de la garantía de calidad	142

LA GARANTIA DE LA CALIDAD EN EL LABORATORIO MICROBIOLOGICO DE CONTROL DE LOS ALIMENTOS

1. ADMINISTRACION

1.1 Objetivos del laboratorio

Los objetivos del laboratorio deben definirse claramente y expresarse con la mayor simplicidad posible. La claridad de la definición es de importancia fundamental, porque en ella se basan todas las actividades del laboratorio. El director del laboratorio debe definir los objetivos después de recabar las opiniones que estime oportunas, y según las instrucciones que haya podido recibir de sus superiores. En la definición debe figurar una referencia a la calidad de los resultados, su puntualidad y su rentabilidad. Los objetivos pueden exponerse en una serie de declaraciones distintas. Deben incluirse todos los aspectos esenciales para el funcionamiento del laboratorio, evitando no obstante los pormenores.

El principal objetivo de un laboratorio es producir resultados fiables, por lo que ésta es la actividad que debe recibir mayor atención. Un laboratorio cuyos resultados no sean suficientemente fiables no es probable que sea aceptado en ningún mecanismo gubernamental. La garantía de calidad de estos resultados no es una carga adicional o una actividad suplementaria que pueda tomarse o dejarse, sino que constituye uno de los instrumentos fundamentales de administración para el director y su personal, con miras a alcanzar los objetivos fijados.

Los objetivos de calidad han de ser tan realistas como cualquier otro objetivo. El objetivo general del laboratorio puede definirse como sigue: producir datos analíticos de precisión y fiabilidad suficientes en un plazo aceptable y a un costo admisible.

El objetivo de calidad puede definirse como la seguridad, en la medida de lo posible, de que se ha obtenido la respuesta aproximadamente correcta. Este punto precisa aclaraciones. ¿Qué se entiende por "seguridad en la medida de lo posible"? Se entiende un grado de seguridad tal que, de demostrarse posteriormente que los resultados estaban equivocados, ello no afecte a la integridad, probidad o competencia técnica del personal del laboratorio. ¿Y qué significa "aproximadamente"? Significa obtener un resultado que sea suficientemente adecuado para la finalidad a la que se destina. Si una muestra resulta gravemente deficiente en un determinado analito, no es probable que las proporciones precisas de la deficiencia sean muy importantes para, digamos, un litigio ante los tribunales o el rechazo de envío. A medida que las proporciones del analito se aproximan al límite legal, la precisión del análisis adquiere mayor importancia, hasta que se llega a un punto en que el resultado se acerca más al límite que la precisión del método. Así, tanto la exactitud como la precisión han de ser mayores para las muestras marginales que para aquellas cuyos resultados distan mucho de cualquier norma o límite.

La garantía de la calidad (GC) es la función de administración que garantiza la calidad de los resultados. Es una función que debe llevarse a cabo en la medida en que sea necesaria, ni más ni menos, y ha de formar parte integrante del cometido cotidiano de los administradores. Es importante tener en cuenta que esta función consiste no sólo en obtener la respuesta correcta, sino también en ser capaz de demostrar que se ha obtenido la respuesta correcta, y proporcionar la prueba documental de ello. La primera introducción de procedimientos escritos de GC en un laboratorio requiere un considerable cambio de las actitudes. Si se introduce adecuadamente, la GC surte efectos positivos en la moral del personal, que adquiere mayor confianza en los resultados y siente que es capaz de demostrar la veracidad de esos resultados. La garantía de la calidad centra la atención en los aspectos pertinentes de las actividades diarias y las necesidades de capacitación, y ayuda al personal a mejorar sus conocimientos y promover su carrera.

1.2 Definición de la garantía de la calidad y el control de calidad

Aunque no parece que el término "garantía de la calidad" requiera mayores explicaciones, con frecuencia se confunde con "control de calidad", o se emplea en vez de éste. Garfield (8) define el control de calidad como "un sistema planeado de actividades cuya finalidad consiste en proporcionar un producto de calidad". En el caso de un laboratorio de control de los alimentos, este producto de calidad sería un resultado analítico válido. Este mismo autor define la garantía de la calidad como "un sistema planeado de actividades cuya finalidad consiste en proporcionar la garantía de que el programa de control de calidad da resultados efectivos". Para Garfield, la "garantía de la calidad" abarca las dos definiciones.

Taylor (6,9) emplea términos y definiciones algo distintos. Para él, el objetivo de un programa de garantía de la calidad estriba en reducir los errores a niveles aceptables y dar seguridades en el sentido de que los datos reúnen muchas probabilidades de ser de calidad aceptable. Intervienen aquí otros dos conceptos: "control de calidad", que Taylor define como "el mecanismo establecido para controlar errores", y "estimación de la calidad", que para él es "el mecanismo para verificar que el sistema funciona dentro de límites aceptables".

Hay aún otro término, el "sistema de calidad", definido por un grupo de trabajo de la Conferencia Internacional de Acreditación de Laboratorios (7) como "las estructuras, responsabilidades, actividades, recursos y eventos de organización que proporcionan en conjunto procedimientos y métodos organizados de ejecución para garantizar la capacidad de la organización de reunir los requisitos de calidad". Según el grupo de trabajo, el sistema de calidad abarca todos los elementos del control y la garantía de la calidad.

Así pues, el control de calidad puede considerarse una combinación de sistemas, procedimientos, actividades, instrucciones e inspecciones de la administración para controlar y mejorar la calidad de la labor efectuada. En cambio, la garantía de calidad es el sistema de actividades que da a la administración la confianza en que los sistemas de control de calidad están instalados y son capaces de producir resultados analíticos de la máxima calidad.

1.3 Ventajas de un programa de garantía de la calidad

Un programa de garantía de la calidad que funcione adecuadamente presenta varias ventajas. en primer lugar, proporciona un registro de seguimiento que garantiza la integridad de la muestra, con documentación para verificar que los instrumentos de laboratorio funcionan adecuadamente y que los datos del laboratorio se produjeron según los procedimientos aprobados. Esta documentación es especialmente importante en los laboratorios reglamentarios, donde los hallazgos analíticos deben someterse a la prueba de su examen en los tribunales.

Una segunda ventaja son los ahorros de tiempo y costos de análisis. Aunque en un principio pueda parecer que el programa de garantía de la calidad reduce la productividad del laboratorio, en realidad puede economizar tiempo y costos de análisis a plazo largo, puesto que los análisis tenderán a hacerse ya correctamente la primera vez.

Una tercera ventaja de los programas de garantía de calidad es que contribuyen a identificar las necesidades de capacitación de los analistas. Esta capacitación no se limita a los nuevos contratados, sino que ha de aplicarse también a los empleados veteranos cuyo rendimiento sea deficiente, o que necesiten actualizar sus conocimientos.

Una cuarta ventaja sería la mayor confianza del analista, al saber que sus resultados son fiables. Esta mayor confianza, a su vez, dará lugar a una mejora de la moral y el rendimiento.

Otras ventajas de un programa de garantía de la calidad son:

- La seguridad de que los errores se reducen al mínimo o se eliminan. Es imposible eliminar todos los errores, pero puede garantizarse que se cometerán muy pocos errores graves que no se descubran antes de que los resultados salgan del laboratorio.

- La garantía de la credibilidad forense. Existe una larga y sólida tradición del empleo de ensayos de laboratorio en los tribunales a título de prueba. Los criterios para la búsqueda de pruebas científicamente válidas son igualmente rigurosos, pero ello no significa necesariamente que la prueba haya de ajustarse a las normas forenses o sea comprensible para el tribunal. Por ejemplo, si el ensayo legal está "más allá de toda duda razonable", el tribunal podría tener dificultades en equipararlo con la información estadística sobre las probabilidades.

- La garantía, en caso de una investigación o un litigio, de que la administración confía en los resultados producidos. Esta confianza se deriva de los antecedentes que van acumulándose, y que testimonian el rendimiento del laboratorio en los diversos análisis que se le confían.

1.3 Ventajas de un programa de garantía de la calidad

Un programa de garantía de la calidad que funcione adecuadamente presenta varias ventajas. en primer lugar, proporciona un registro de seguimiento que garantiza la integridad de la muestra, con documentación para verificar que los instrumentos de laboratorio funcionan adecuadamente y que los datos del laboratorio se produjeron según los procedimientos aprobados. Esta documentación es especialmente importante en los laboratorios reglamentarios, donde los hallazgos analíticos deben someterse a la prueba de su examen en los tribunales.

Una segunda ventaja son los ahorros de tiempo y costos de análisis. Aunque en un principio pueda parecer que el programa de garantía de la calidad reduce la productividad del laboratorio, en realidad puede economizar tiempo y costos de análisis a plazo largo, puesto que los análisis tenderán a hacerse ya correctamente la primera vez.

Una tercera ventaja de los programas de garantía de calidad es que contribuyen a identificar las necesidades de capacitación de los analistas. Esta capacitación no se limita a los nuevos contratados, sino que ha de aplicarse también a los empleados veteranos cuyo rendimiento sea deficiente, o que necesiten actualizar sus conocimientos.

Una cuarta ventaja sería la mayor confianza del analista, al saber que sus resultados son fiables. Esta mayor confianza, a su vez, dará lugar a una mejora de la moral y el rendimiento.

Otras ventajas de un programa de garantía de la calidad son:

- La seguridad de que los errores se reducen al mínimo o se eliminan. Es imposible eliminar todos los errores, pero puede garantizarse que se cometerán muy pocos errores graves que no se descubran antes de que los resultados salgan del laboratorio.

- La garantía de la credibilidad forense. Existe una larga y sólida tradición del empleo de ensayos de laboratorio en los tribunales a título de prueba. Los criterios para la búsqueda de pruebas científicamente válidas son igualmente rigurosos, pero ello no significa necesariamente que la prueba haya de ajustarse a las normas forenses o sea comprensible para el tribunal. Por ejemplo, si el ensayo legal está "más allá de toda duda razonable", el tribunal podría tener dificultades en equipararlo con la información estadística sobre las probabilidades.

- La garantía, en caso de una investigación o un litigio, de que la administración confía en los resultados producidos. Esta confianza se deriva de los antecedentes que van acumulándose, y que testimonian el rendimiento del laboratorio en los diversos análisis que se le confían.

- La garantía, en caso de investigación o litigio, de que existen registros que permitirán resolver la cuestión. Los registros deben conservarse mucho tiempo; de ordinario se opta por un período de seis años.

- La realización de un examen de las deficiencias, errores o reclamaciones que permita tomar sistemáticamente medidas correctoras, con las consiguientes mejoras intrínsecas.

- La garantía de que la utilización de los recursos es óptima. Este es, a menudo, un proceso lento, pero a medida que se va acumulando información acerca del rendimiento analítico del laboratorio, resulta más fácil evaluar la eficacia de la utilización de los recursos en el laboratorio. Esto, por ejemplo, hace más fácil garantizar la disponibilidad de reactivos que no hayan rebasado la fecha de utilización.

- El suministro de resultados de un grado suficiente de certidumbre que puedan utilizarse en bases de datos para los fines del control de alimentos, la sanidad pública, la nutrición y otras políticas alimentarias locales, nacionales o internacionales. Estas bases de datos constituyen un recurso extremadamente valioso para la vigilancia de productos alimenticios en un plazo determinado. Permiten determinar los cambios experimentales por los productos con el tiempo, y comparar fácilmente los resultados de los análisis. Si las bases de datos no contienen información fiable, será muy fácil extraer conclusiones falsas.

1.4 Definición de responsabilidades

Responsabilidades de la administración

Por desgracia, el sector de la garantía de la calidad en el conjunto de las operaciones de un laboratorio con frecuencia recibe escasa atención, o puede no estar suficientemente equilibrado. Por ejemplo, puede ocurrir que sea tan detallado que abarque prácticamente todas las funciones analíticas. Este tipo de programa, aunque parezca atrayente y ventajoso, puede ser abrumador y frustrante para el personal del laboratorio. Es posible pues que lo que empezó como una empresa admirable acabe en el desaliento y en la ausencia de todo programa significativo de garantía de calidad. En el otro extremo encontramos el programa tan resumido que en realidad está desprovisto casi totalmente de significado. Corresponde a la administración decidir el alcance y la prioridad de un programa de garantía de la calidad para el laboratorio, basando su decisión en el cálculo de beneficios/costos. Cuando se haya seleccionado un programa en particular, la administración deberá apoyar plenamente su aplicación, mantenimiento y concepción. Si parece que la administración no apoya el programa, no es de esperar una plena dedicación del personal.

Una vez el programa de garantía de la calidad se haya incorporado al funcionamiento diario del laboratorio, la administración deberá dedicarle recursos y crear una unidad de garantía de la calidad que ponga en práctica las correspondientes directrices. la administración

debe proyectar una imagen positiva del programa de garantía de la calidad. El programa no ha de verse como algo amenazador, conflictivo o que acarrea más trabajo, sino que debe proyectarse como un instrumento destinado a mejorar la labor de los empleados y como un mecanismo para documentar y premiar los rendimientos sobresalientes.

Muchos analistas empezaron su vida laboral en laboratorios en los que no se practicaba la garantía de calidad tal y como la conocemos hoy. Existen aún laboratorios que trabajan de esta manera, aunque cada vez menos. Así pues, en un momento determinado estos analistas tienen que cambiar su estilo de trabajo y adoptar una actitud positiva hacia la garantía de calidad. Para ello han de superar muchos obstáculos.

El analista puede pensar que toda su labor anterior está en entredicho por no haberse llevado a cabo con arreglo al nuevo sistema. La garantía de calidad consume mucho tiempo en un principio. El analista estará probablemente seguro de que su jornada de trabajo ya es completa, y que todo lo que hace es esencial. Por consiguiente, pensará, el nuevo método de trabajo no es aplicable, y además es innecesario y absorbe tiempo. La administración puede fácilmente empeorar estos sentimientos negativos, por falta de tacto en el trato con el personal, poca dedicación o comprensión deficiente. Desgraciadamente, la garantía de calidad se introduce muchas veces como resultado de presiones externas, por la necesidad de acreditación o bien porque la reputación del laboratorio ha quedado en entredicho al descubrirse un error.

Es posible que la introducción del concepto de garantía de la calidad deba promoverse tanto dentro como fuera del laboratorio. En primer lugar, habrá que recabar la aceptación de quienes intervienen en las decisiones relativas a la financiación del laboratorio. Puede resultar difícil persuadir a los políticos y a los legisladores, cuyos conocimientos técnicos quizás sean escasos, de la necesidad de un gasto adicional, y siempre se podrá oponer el argumento de que el laboratorio parece haber funcionado satisfactoriamente durante mucho tiempo con el viejo sistema, y no está justificado incurrir en nuevos gastos.

Con frecuencia deben explicarse los cambios registrados en la situación. El peligro de que se pongan en duda los resultados del laboratorio ha existido siempre, pero este peligro aumenta cuando otros laboratorios adoptan la garantía de calidad y mejoran la tecnología y la gestión. Quienes adoptan las decisiones se ven frente a conceptos cambiantes del uso de la tecnología. La creciente automatización e informatización desvía la atención de las técnicas de manipulación requeridas para métodos a menudo lentos y aburridos, centrándola en cambio en las técnicas administrativas y de gestión que hacen falta para garantizar la calidad de grandes cantidades de datos. Se produce pues un cambio en el entorno interior del laboratorio, que pasa del muestreo aleatorio a los programas de muestreo, de una o unas pocas muestras a lotes óptimos de un mismo tipo de productos, de la virtuosidad analítica a los resultados de calidad garantizada, de reaccionar a los acontecimientos a la política de observancia de la ley alimentaria. El enfoque sistemático de la gestión, que permite conseguir mejoras en la rentabilidad y la utilización de los recursos, no puede aplicarse sin una garantía de la calidad.

Las decisiones acerca de la naturaleza y el tamaño de la unidad de garantía de la calidad son de la incumbencia de la administración. En los grandes laboratorios multidisciplinarios la dependencia encargada de la garantía de la calidad puede componerse de dos o más personas cuya única responsabilidad consista en vigilar la eficacia del programa de garantía de la calidad. En los laboratorios más pequeños, puede ocurrir que la administración no desee una unidad encargada exclusivamente de la garantía de calidad, y en cambio asigne a un experto que dedicará parte de su jornada laboral a vigilar el cumplimiento de un programa aprobado de garantía de la calidad en el laboratorio.

La administración debe determinar también la frecuencia de las comprobaciones formales del grado de cumplimiento de los programas aprobados de garantía de calidad. Algunos administradores pueden disponer que se efectúen inspecciones trimestrales, o incluso mensuales. Otros preferirán inspecciones trimestrales reducidas, y una amplia inspección anual completa. Independientemente de la frecuencia de las inspecciones, la administración ha de examinar los resultados de la unidad encargada de la garantía de calidad y adoptar medidas a tenor de sus recomendaciones. La administración puede premiar a los empleados que hayan observado mejor las prescripciones del programa de garantía de la calidad. Por ejemplo, un procedimiento cada vez más utilizado para premiar el rendimiento de los empleados es el de la "prima por méritos". Uno de los criterios para la concesión de esta clase de primas podría basarse en la garantía de calidad, lo que permitiría a la administración motivar a los empleados para que aplicasen extrictamente el programa aprobado de garantía de la calidad. En los casos de incumplimiento del programa, la administración quizás tenga que recurrir a medidas disciplinarias.

Además de examinar las recomendaciones de la unidad de garantía de la calidad, la administración deberá pasar revista periódicamente a la política de garantía de calidad y al propio programa. Aunque tanto la política como las correspondientes disposiciones deben observarse rigurosamente, hay que dejar un margen suficiente de flexibilidad para las desviaciones razonables que pueden producirse cuando las disposiciones del programa original de garantía de calidad son demasiado específicas, o no lo son bastante. Si las desviaciones son demasiado específicas, es posible que deba modificarse el programa. La administración deberá pasar revista constantemente a la política y el programa de garantía de la calidad, e introducir las modificaciones que sean menester.

En resumen, la garantía de calidad no pasará a formar parte integrante de las actividades de una organización sin la dedicación y el esfuerzo necesarios de la administración. El trabajo inicial es considerable: redactar un manual de calidad, producir datos sobre el control de calidad y organizar el sistema de calidad. El apoyo de la administración en esta fase es esencial, y puede manifestarse en forma de aliento, asesoramiento y consignación de los recursos adecuados. La garantía de la calidad se desacredita cuando el administrador se muestra dispuesto a recurrir a métodos superados para alcanzar un objetivo a corto plazo, como hacer muy deprisa el informe de una muestra por causa de apremio. Este es el caso típico en que se cometen errores. Asimismo, la administración puede dar a conocer de manera muy eficaz la importancia que atribuye al programa, insistiendo en un estricto cumplimiento del calendario de inspecciones y exámenes, y mostrándose muy interesada en las medidas de seguimiento. Las inspecciones, y las medidas que se adoptan en consecuencia, representan

el mecanismo de cambio incorporado al sistema de garantía de la calidad, y reflejan pues en gran medida la eficacia del programa.

Responsabilidades de la unidad de garantía de la calidad

El primer paso en la constitución de una unidad de garantía de la calidad será, en general, obtener la aprobación presupuestaria para el nombramiento de un oficial de garantía de la calidad y el personal que pueda necesitar, o el acuerdo para dedicar personal ya contratado y otros recursos a esa actividad. El oficial de GC deberá poseer preferiblemente una capacitación formal en materia de garantía de calidad, aunque esto no siempre es posible. Lo más probable es que el analista que reciba este encargo deba adquirir por su cuenta la formación, asistiendo a cursos, etc. Esta persona deberá ser un analista de cierto nivel, y granjearse el respeto de sus subordinados por su competencia técnica. El oficial de GC ha de esforzarse en entender los principios de la GC, y aplicarlos correctamente.

El oficial de GC necesita inspectores, que habitualmente designará entre los analistas de que disponga. En un laboratorio pequeño basta un equipo de dos personas que inspeccione todas las secciones, incluida la administración, excepto la suya propia. En un laboratorio más grande el oficial de GC quizás necesite una plantilla propia, pero de ordinario la unidad de GC no suele ser muy numerosa. La proporción adecuada será probablemente de un empleado de GC por cada diez o veinte analistas. Cuanto mayor sea la variedad de los análisis efectuados, y menor el nivel general de experiencia, más necesaria será la garantía de calidad.

La unidad de garantía de la calidad es responsable de la redacción del plan o manual de garantía de la calidad, y de la observancia del programa por parte del personal del laboratorio. La unidad sirve de enlace entre la administración, que ha consignado recursos para asegurar el éxito del programa, y el personal del laboratorio, que es directamente responsable de la realización práctica del programa. La unidad, además, recurre al personal, en particular los científicos del laboratorio y el jefe del equipo, para obtener el asesoramiento técnico que necesita durante la redacción del plan de garantía de la calidad.

La unidad de GC rinde informes directamente a la administración. Además de programar y llevar a cabo las comprobaciones e inspecciones, el personal de GC debe formular recomendaciones a la administración respecto de los resultados de esas comprobaciones, recomendar políticas de garantía de la calidad a la administración y ayudar en su preparación, identificar las necesidades de capacitación del personal y dictar normas en relación con todos los aspectos del programa de garantía de la calidad.

Uno de los medios por los que la administración apoya esta actividad es prestando especial atención a las inspecciones y comprobaciones y a las actividades de seguimiento. Este sistema regular y bastante formal proporciona la disciplina necesaria para mantener en funcionamiento el programa. El oficial de GC y, cuando proceda, los miembros de su unidad, deben gozar de acceso directo al director del laboratorio o a su adjunto. Esto permitirá examinar enseguida cualquier informe de una inspección o sobre una irregularidad, y adoptar las disposiciones del caso.

Deberían celebrarse una o dos reuniones de revisión al año. En esta ocasión, la administración, en consulta con el oficial de garantía de la calidad y los principales analistas, podrá decidir los eventuales cambios en las políticas o el programa. La necesidad de los cambios se infiere de las inspecciones de la calidad.

Responsabilidades del analista

El analista desempeña un papel esencial en la aplicación de un programa de GC. El científico capacitado en los análisis de laboratorio es responsable de la calidad de los datos y otras actividades conexas del laboratorio, y es el primero que puede detectar un funcionamiento deficiente del sistema analítico. El personal de análisis ha de ser capaz de distinguir entre una fluctuación normal aleatoria y una desviación anormal.

Tanto la administración como la unidad de garantía de la calidad necesitan la colaboración y el asesoramiento del personal de análisis en la formulación del programa de GC. Puede pedirse incluso a algunos analistas que redacten parte del plan de garantía de la calidad, con sujeción a la posterior comprobación y visto bueno de la unidad de GC y la administración. La formulación del plan de garantía de calidad puede constituir un factor de motivación para el personal, que tendrá así la sensación de que contribuye creativamente al programa de GC.

El personal del laboratorio es responsable de la observancia de las disposiciones del plan aprobado. El éxito o el fracaso del plan dependen en último término del rendimiento del analista. El científico de laboratorio, que constituye en la práctica el primer nivel de la "administración" de cualquier programa de garantía de la calidad, es responsable de que el trabajo se haga bien, de documentarlo y de revisarlo para asegurarse de que su nivel es aceptable.

Así pues, cada uno de los tres grupos (personal de análisis, unidad de garantía de la calidad y administración) ha de aportar su contribución al éxito de un programa de garantía de la calidad. El personal de análisis aporta los conocimientos técnicos necesarios para la preparación del plan de garantía de la calidad, y es responsable de su cumplimiento diario.

La unidad de garantía de la calidad vigila la observancia del plan por parte del personal y, sobre la base de sus comprobaciones, hace recomendaciones a la administración. Esta, a su vez, examina los informes de la unidad y toma medidas en consecuencia.

1.5 Referencias

Las obras que se indican a continuación proporcionan los antecedentes generales de la gestión de los programas de garantía de la calidad.

1. NAMAS Executive 1989. General criteria of Competence for Calibration and Testing Laboratories. National Physical Laboratory, Teddington, TW11 OLW, Reino Unido.

2. Uelner, A.F. 1984. The Watchdog of the Industry, Concepts, Toxicol. 1 (93-102) Karger, Basilea, Suiza.

3. Kilshaw, D. Quality Control & Assurance, MLW, junio de 1986, pp. 25 y 26.

4. Loftus, P. 1986. Quality Assurance. Water Bulletin Supplement 21.3.86, pp. 3 y 4.

5. Waddell, A. 1988. The Importance of Quality, International Good Laboratory Practice Conference, Stratford, Reino Unido.

6. Taylor, J.K. The Quest for Quality Assurance, American Laboratory, octubre de 1985, 67-75.

7. Anónimo. 1984. Report of Task Force "D" at the International Laboratory Accreditation Conference, London, U.K. Department of Trade and Industry, Londres, Reino Unido.

8. Garfield, F.M. 1984. Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

9. Taylor, J.K. 1987. Quality Assurance of Chemical Measurements, Lewis Publishers, Inc., Chelsea, MI.

10. Weatherwax, J. y P.G. Martin. 1986. Manuales para el Control de Calidad de los Alimentos. 1. "The Food Control Laboratory", 2ª edición. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia.

2. EL PROGRAMA DE GARANTIA DE LA CALIDAD

2.1 Definición

Un programa de garantía de la calidad es un mecanismo destinado a garantizar que los datos producidos por un laboratorio son de la máxima calidad. Esta garantía se consigue asegurándose de que todas las operaciones del laboratorio se llevan a cabo del modo previsto. Además, la documentación existente permite actualizar los datos según sea menester.

2.2 Preparación

Para preparar un programa de garantía de la calidad, debemos considerar antes sus diversos elementos. El National Institute for Occupational Safety and Health (Instituto Nacional de Seguridad y Sanidad del Trabajo) (1) de los EE.UU. ha identificado más de 20 elementos que pueden formar parte de un programa de garantía de la calidad:

a) Declaración de objetivos
b) Declaraciones de políticas
c) Organización
d) Planificación de la calidad
e) Procedimiento operativo estándar
f) Registros
g) Procedimientos de custodia
h) Medidas correctivas
i) Capacitación en materia de calidad
j) Control de documentos
k) Calibración de instrumentos
l) Mantenimiento preventivo
m) Reactivos y normas de referencia
n) Adquisición y control
o) Identificación y control de muestras
p) Análisis y control de laboratorio
q) Programas de ensayos inter et intralaboratorios
r) Manejo, almacenamiento y entrega de muestras
s) Control de la calidad estadística
t) Validación de datos
u) Inspecciones del sistema.

El elemento (e) se denomina Procedimiento Operativo Estándar (POE). Por procedimiento operativo estándar se entiende un documento en el que se describa cualquier procedimiento que no sea un método de análisis. Puede tratarse de un procedimiento administrativo rutinario, un procedimiento no analítico de laboratorio, como la puesta en funcionamiento de un instrumento, o cualquier otro procedimiento aplicado en el laboratorio. De ordinario el POE describe una actividad con el detalle suficiente para que pueda llevarse a cabo sin supervisión, y en algunos casos sin capacitación previa. Un método de análisis

puede redactarse en el formato de un POE, pero es preferible que se le considere un tipo distinto de documento. La garantía de calidad abarca todas las actividades operativas de un laboratorio, y no sólo el análisis. Todas esas actividades son controladas (y sólo pueden serlo) si existe un registro escrito de las mismas, o tal vez un registro informatizado, que normalmente va acompañado también de un registro escrito. Este registro escrito es el Procedimiento Operativo Estándar.

Debido a la diversa naturaleza de los laboratorios de control de los alimentos, un solo programa uniforme no puede abarcar todas las actividades del laboratorio. Un programa de garantía de la calidad debe adaptarse a las funciones del laboratorio en el que se aplique, aunque no es necesario que sea tan específico que sólo pueda utilizarlo un laboratorio. Un buen programa de garantía de calidad ha de ser suficientemente flexible para que pueda adaptarse, con ligeras modificaciones, a las actividades de diferentes laboratorios que realicen tareas esencialmente similares.

Un programa eficaz de garantía de la calidad es sencillo. Su redacción ha de ser clara, concisa y sin complicaciones, evitando las exposiciones aburridas o demasiado largas y la proliferación de detalles innecesarios o anodinos. Un programa demasiado complejo suscitará probablemente la hostilidad de los analistas, con la consiguiente perdida de interés.

Un programa eficaz de garantía de la calidad ha de ser práctico desde el punto de vista del tiempo de análisis y los costos. Si hace falta dedicar una proporción excesiva de la jornada laboral de los analistas para llevarlo a cabo, el programa no está suficientemente equilibrado. Un programa eficaz debe redundar en un ahorro del tiempo y los costos de análisis, ya que pocas veces hará falta repetir éstos.

No todos los 21 elementos mencionados son menester para la preparación de un programa de garantía de la calidad. Cada elemento debe recibir su propia prioridad en el programa correspondiente. Garfield (2) ofrece una formulación algo más simple de un programa de garantía de la calidad, proponiendo tres elementos esenciales:

a) Prevención, que precisa un programa ordenado de planificación y una serie de medidas positivas antes de los análisis o durante éstos, para asegurarse de que todos los sistemas analíticos funcionan adecuadamente (p.e. calibración y mantenimiento de los instrumentos, utilización de cultivos microbiológicos estándar, y capacitación)

b) Evaluación, forma de control que comprende comprobaciones periódicas del rendimiento de los analistas (p.e. análisis de muestras seleccionadas y validación de la metodología).

c) Corrección, medida adoptada para determinar las causas de los defectos de calidad y restablecer el funcionamiento adecuado de las operaciones analíticas (p.e. reparación de máquinas averiadas, reevaluación de metodologías y capacitación de reciclaje).

La forma final que adopte el programa de garantía de la calidad es una decisión a la vez científica y de administración. Las operaciones cotidianas de análisis del laboratorio de control de los alimentos deben determinar los elementos que hagan falta en el programa. A renglón seguido la administración deberá establecer las prioridades de esos elementos y determinar la medida en que se asignarán al programa los recursos destinados al análisis.

2.3 El manual de garantía de la calidad

Cada laboratorio que aplique un programa de garantía de la calidad debe disponer de un manual que documente sus operaciones. El Environmental Protection Agency (Organismo de Protección Ambiental) de los Estados Unidos (3) define el manual de garantía de la calidad en los términos siguientes: un documento escrito en el que se describen las políticas, organización, objetivos, actividades funcionales y actividades concretas de garantía de la calidad, destinados a alcanzar los objetivos de calidad a que aspira el laboratorio. Un manual típico podría componerse de lo siguiente:

a) Portada, con las firmas de todos los oficiales certificadores.
b) Indice.
c) Estructura de organización y lugar exacto que corresponde al laboratorio en esa estructura.
d) Objetivos del programa de garantía de la calidad.
e) Inclusión de elementos esenciales del programa de garantía de la calidad, según se han indicado anteriormente.
f) Formularios de documentación.
g) Rendimiento y frecuencia de las inspecciones.
h) Medidas correctivas y de seguimiento.

El manual de GC debe contener una exposición de la política de garantía de la calidad, de carácter general y específico. Por ejemplo, el Manual de Garantía de la Calidad del Bureau of Foods (Oficina de Alimentos) de la Food and Drug Administration de los EE.UU. contiene una declaración general de política: "El Programa de Garantía de la Calidad de la Oficina de Alimentos tiene por finalidad mantener el máximo nivel de calidad e integridad de los datos de la Oficina. Las políticas, procedimientos e instrucciones del Manual establecen un programa de garantía de la calidad uniformemente aplicable a todos los servicios de laboratorio de la Oficina. El presente Manual abarca los estudios no clínicos de laboratorio, otros estudios de laboratorio y las muestras reglamentarias. Todo el personal de laboratorio que participe en la supervisión o realización de los trabajos de laboratorio deberá atenerse obligatoriamente a las instrucciones del manual".

Además de una declaración de política general, en el manual aparecen declaraciones específicas de política, como por ejemplo la definición de las responsabilidades de los diversos niveles de gestión en la aplicación del programa, una lista de laboratorios (independientemente de su emplazamiento) a los que se aplica el programa de garantía de la calidad, referencias a la metodología recomendada de laboratorio, titularidad de los derechos de propiedad de los datos del laboratorio, y cualesquier excepciones a las declaraciones de políticas.

En el Anexo 1 figura un ejemplo de algunos de los elementos que podrían incluirse en un manual de GC, con los correspondientes comentarios.

2.4 Aplicación

La aplicación efectiva de un programa de garantía de la calidad es un esfuerzo cooperativo en el que participan la administración, los miembros de la unidad de garantía de la calidad y los analistas. La administración decide la proporción de recursos que deben asignarse al programa de GC. Esta decisión determina la naturaleza y el tamaño de la unidad de garantía de la calidad. En la preparación del plan de garantía de la calidad, la unidad recibe la contribución técnica de los analistas. Una vez formulado por la unidad de garantía de la calidad y aprobado por la administración, el plan de GC entra en funciones. En adelante, los analistas se encargan de su aplicación diaria. La unidad verifica periódicamente el nivel de observancia del plan y presenta un informe, con las correspondientes recomendaciones, a la administración, la cual toma medidas en consecuencia para facilitar el cumplimiento del programa.

2.5 Referencias

1. National Institute of Occupational Safety and Health, 1976. Specification for Industrial Hygiene Laboratory Quality Program Requirements. National Institute for Occupational Safety and Health, Cincinnati, OH.

2. Garfield, F.M. 1984. Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories. Association of Analytical Chemists, Arlington, VA.

3. U.S. Environmental Protection Agency, 1980. Guidelines and Specifications for Preparing Quality Assurance Project Plans. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH.

4. U.S. Food and Drug Administration, 1982. Bureau of Foods Laboratory Quality Assurance Manual. U.S. Food and Drug Administration, Washington, DC.

3. EL LABORATORIO

3.1 Diseño del laboratorio

Aunque el diseño final del laboratorio lo hacen los arquitectos e ingenieros, el personal de análisis debe participar en algunas de las decisiones que afectarán, finalmente, a su medio de trabajo y las condiciones en que éste se desarrolle. A continuación exponemos varios puntos que deberán considerar los analistas, si se les pide que colaboren en el diseño de su laboratorio.

Weatherwax y Martin (1) han hecho un examen completo y detallado del establecimiento de un laboratorio de control de alimentos. El laboratorio de control de alimentos puede desempeñar diversas funciones: análisis de los alimentos para la detección de oligometales, aditivos, nutrientes y toxicantes, y microbiología básica de los alimentos. En este capítulo examinaremos los pormenores de interés para el diseño de un laboratorio de microbiología de los alimentos.

Consideraciones generales

La disposición del laboratorio debe diseñarse con criterios de eficiencia. Por ejemplo, la distancia que deba recorrer el personal para llevar a cabo las distintas fases de los procesos analíticos ha de ser lo más corta posible.

El diseño debe prever espacio para los servicios auxiliares. Entre éstos ha de figurar un taller, salvo que pueda recurrirse a contratistas externos para todos los aspectos de mantenimiento del laboratorio, como la fontanería, los suministros eléctricos y el servicio de los aparatos electrónicos y eléctricos no relacionados con los análisis.

Hacen falta despachos para los administrativos, baños y aseos y una cantina, por sencilla que sea. Hay que prever un almacén para las muestras, el equipo, los productos químicos y el instrumental de vidrio. El depósito de las muestras ha de estar protegido contra los parásitos.

El laboratorio de microbiología

En condiciones ideales, el laboratorio de microbiología no debe ocupar una sola sala polivalente, sino más bien una serie de habitaciones dedicadas al almacenamiento del instrumental de vidrio y de los medios deshidratados, la preparación y esterilización de los medios, los animales vivos (de haberlos), la descontaminación de materias patógenas o peligrosas, y el personal. Los laboratorios reglamentarios necesitan zonas separadas para el almacenamiento de las muestras que todavía no se han analizado, y las muestras ya analizadas que pasan a la reserva. No obstante, en realidad este requisito no siempre puede cumplirse, y ha de optarse por una solución intermedia. Muchos laboratorios de microbiología pueden consistir en una sola habitación que contenga un banco central de trabajo en el que se preparen los medios y se efectúen los análisis microbiológicos. Esta sala podría contener

también áreas de almacenamiento de diversos tamaños para los medios y los instrumentos de vidrio. Sin embargo hay otras funciones, como la descontaminación de materias patógenas, el almacenamiento de las muestras recién llegadas, el almacenamiento de las muestras de reserva y el mantenimiento de animales, que no pueden efectuarse en una sola habitación. Los medios, los reactivos y los instrumentos de vidrio que deban almacenarse en la misma habitación en que se llevan a cabo los análisis microbiológicos habrán de guardarse en envases herméticamente cerrados, y todos los artículos deberán almacenarse en armarios limpios de polvo, preferiblemente con puertas corredizas de vidrio. Estas puertas deben estar permanentemente cerradas, salvo cuando haya que acceder a los armarios.

Un autoclave de carga lateral es quizás el instrumento más costoso para muchos laboratorios de microbiología. Aún así, es recomendable utilizar autoclaves distintos para la esterilización de los soportes y para la descontaminación de materias patógenas, a fin de reducir al mínimo las posibilidades de contaminación mutua. Idealmente los dos autoclaves deberían estar en habitaciones distintas o, por lo menos, a bastante distancia el uno del otro, si están en la misma habitación.

Mientras que en los grandes laboratorios de microbiología el instrumental de vidrio se envía a lavar a un servicio completamente centralizado e independiente del laboratorio, en los laboratorios pequeños puede suceder que el personal se encargue de lavar su propio instrumental. Si ello es así, los instrumentos de vidrio pueden lavarse en la misma habitación en que se encuentra el autoclave de descontaminación de materias patógenas o, si es necesario, en la habitación donde están los dos autoclaves, el destinado a esterilizar los soportes y el que sirve para descontaminar las materias patógenas.

Debe considerarse la conveniencia de prever una habitación propia para el personal, por pequeña que sea, ya que ello no sólo proporciona un mayor grado de seguridad al personal del laboratorio, sino que además contribuye a asegurar la integridad de las muestras. Comer, beber o fumar suele desaconsejarse, y a menudo prohibirse, en los locales del laboratorio propiamente dicho; corresponde a la administración prever otros locales con estos fines.

Para facilitar una rápida evacuación en caso de incendio o cualquier otra emergencia, deben preverse por lo menos dos entradas/salidas en cada habitación, siempre que sea posible. Las entradas han de ser de forma que reduzcan al mínimo el tránsito de personas.

Cuando se diseñe un nuevo laboratorio debe tenerse en cuenta la posible expansión del personal y las actividades. En la mayor parte de laboratorios que se han trasladado a un nuevo emplazamiento y han reanudado las operaciones, los locales parecen quedarse pequeños enseguida. Así pues, los administradores deben tener presentes las proyecciones de la plantilla para el futuro, el número y tipo de muestras y las necesidades de equipo.

Los muros deben pintarse con una pintura impermeable y a prueba de moho, que proporcione una superficie lisa e impenetrable de fácil limpieza.

En muchos laboratorios de microbiología no se aprovecha suficientemente el espacio de las paredes. De ser posible, las paredes deberían utilizarse para colocar estanterías adicionales, protegidas por puertas corredizas de cristal para almacenar los soportes, productos químicos y otras materias en un lugar exento de polvo.

Dado que los microbiólogos pueden tener que permanecer de pie durante varias horas en una jornada normal de trabajo, los suelos han de ser relativamente cómodos. Baldosines resistentes, lisos y que puedan fregarse rápidamente son muy recomendables. Para mayor comodidad, podrán colocarse felpudos de goma en diversos lugares estratégicos del laboratorio. Las placas de linóleo sobre el cemento no son recomendables, porque los intersticios no pueden limpiarse del todo. Con el tiempo el propio linóleo se agrieta, creando hendiduras donde proliferan las bacterias.

De ser posible, el laboratorio de microbiología debe estar alejado de cualquier lugar en que haya emanaciones de gases o humos de los edificios. El laboratorio de microbiología tiene problemas únicos de contaminación, y conviene que esté equipado con aire acondicionado. El aire acondicionado central ofrece varias ventajas. En primer lugar, el aire que entra es filtrado, con lo que se reduce el peligro de contaminación ambiental del laboratorio. En segundo lugar, las ventanas cerradas reducen al mínimo las corrientes de aire, que pueden causar contaminación. En tercer lugar, las ventanas cerradas también impiden la entrada de moscas y otros insectos voladores que contaminan las muestras o las superficies del laboratorio. En cuarto lugar, el aire acondicionado controla la humedad (un 50 por ciento es óptimo), lo que atenúa los problemas con los soportes higroscópicos y los productos químicos, sobre todo en los países de clima tropical. Además, una humedad excesiva durante un período prolongado puede provocar el crecimiento de mohos en las superficies del laboratorio. Las esporas pueden hacerse aéreas, lo que afectaría a los resultados de los análisis. Por último, el aire acondicionado estabiliza la temperatura de la habitación, lo que permite un funcionamiento más eficaz de las incubadoras. Como muchas incubadoras de aire no tienen un sistema incorporado de refrigeración, sólo pueden mantener temperaturas al mismo nivel que la temperatura ambiente, que por lo general es de 21-23°. Sin embargo, en los países tropicales las temperaturas ambiente pueden ser de más de 30°, o incluso de 35°, y las incubadoras no funcionan bien si la temperatura de la habitación es de más de 23°.

Cuando no se mantiene una temperatura ambiente relativamente constante ello puede afectar al rendimiento o causar un funcionamiento deficiente de los medidores de pH. Una temperatura elevada puede provocar un cambio en la composición o la integridad de medios o reactivos sensibles al calor, o una pérdida de viabilidad de los cultivos de base mantenidos normalmente a 21-23°.

Los ventiladores no son un sustituto recomendable de un sistema eficiente de ventilación, porque levantan polvo y pueden ser una causa importante de contaminación en el laboratorio de microbiología.

Incluso con un sistema central de aire acondicionado, el hollín y otras partículas finas se introducen a través de los orificios de salida del sistema de ventilación, por lo que conviene colocar filtros en esas aberturas. Estos filtros deben cambiarse por lo menos una vez al año,

o con más frecuencia si es necesario. El personal del laboratorio deberá llevar un registro escrito que indique cuando han de sustituirse los filtros.

Cuando participen en el diseño del laboratorio, los microbiólogos podrán considerar la conveniencia de instalar una campana de ventilación o cualquier otro sistema de extracción de humos. Cada campana debe tener su propio suministro de gas, agua, aire comprimido y electricidad. Los ácidos fuertes, los solventes y otras materias semejantes deberán emplearse bajo una campana de este tipo. Para obtener un máximo de eficiencia, la compuerta de la campana deberá bajarse hasta el nivel indicado por el fabricante. La eficiencia del sistema de ventilación debe verificarse todos los años por un representante de la fábrica o por el personal de mantenimiento del edificio. No obstante, el personal del laboratorio deberá llevar un registro escrito de las operaciones de mantenimiento. Las campanas no deben emplearse para el almacenamiento a largo plazo de los materiales. Bajo la campana sólo deberá almacenarse el equivalente de tres días de suministro de productos químicos.

Aunque pueden muy bien preverse algunas ventanas en el diseño del laboratorio, los medios, productos químicos y reactivos deben almacenarse en zonas protegidas contra la exposición directa a la luz del sol, que podría modificar los resultados. Los análisis tampoco deben efectuarse directamente a la luz del sol, porque ello podría alterar las conclusiones.

El banco de trabajo es el centro de la actividad del laboratorio de microbiología. Debe mantenerse despejado para los análisis microbiológicos y no ha de emplearse para almacenar equipo de laboratorio, soportes u otros instrumentos. De ser posible, tampoco debe hacerse servir como soporte de estanterías. El banco debe estar hecho de material no poroso, impermeable y exento de intersticios, empalmes visibles u otras zonas defectuosas en las que puedan crecer los microorganismos. El espacio debajo del banco podrá utilizarse para colocar armarios y estanterías, pero debe preverse un espacio libre de por lo menos 90 cm, para que el analista esté más próximo al banco cuando trabaje sentado. El banco debe estar equipado adecuadamente de grifos de gas, aire enrarecido a presión subatmosférica, aire comprimido, enchufes eléctricos y grifos de agua destilada y de agua corriente, fría y caliente.

Además del banco principal, y separados de éste, deberá haber uno o más bancos laterales auxiliares. Algunas piezas del equipo de laboratorio, como por ejemplo el baño maría, generan vibraciones y por consiguiente no deben colocarse en el mismo banco en el que se coloquen instrumentos delicados, como microscopios o balanzas de análisis.

3.2 Vigilancia ambiental

Consideraciones generales

Hay que vigilar el medio ambiente en el que se encuentran las muestras, sus extractos, el personal y el equipo, para que la calidad de los resultados no se vea afectada. Para ello se comprobarán los registros con miras a determinar que:

1. Las muestras se reciben, almacenan, manejan y analizan en condiciones ambientales que no afecten desfavorablemente a los análisis.

2. Los controles de la temperatura, la humedad y la luz son adecuados en las zonas sensibles, para proteger las muestras, sus extractos, el personal y el equipo.

3. Se llevará un registro de los resultados del muestreo ambiental en los locales del laboratorio.

El laboratorio microbiológico

De ordinario la vigilancia microbiológica del medio ambiente requiere análisis de las superficies y el espacio aéreo del laboratorio, para detectar la presencia de microorganismos. El control de las superficies del laboratorio permitirá determinar la limpieza de una misma zona de trabajo durante un período prolongado, o de diferentes zonas en un momento determinado, la frecuencia necesaria de las operaciones de limpieza, la eficacia de los desinfectantes en los bancos de trabajo y la frecuencia necesaria de la desinfección de éstos, y la eficiencia de la campana de flujo laminar. La vigilancia del aire sirve para verificar la eficacia de los filtros de aire y la frecuencia con que deben cambiarse, así como cualquier fuente posible de contaminación ambiental de las muestras.

La enumeración de los microorganismos en las superficies del laboratorio puede efectuarse bien por el método de frotación (Anexo 2) o bien por el método de contacto directo del agar en el organismo replicado (RODAC) (Anexo 3). El método RODAC es especialmente apto para el muestreo de superficies planas e impermeables. No debe emplearse en superficies irregulares, o en las que presenten intersticios o grietas. Da el mejor resultado en superficies planas que hayan sido limpiadas y desinfectadas, o esterilizadas. Las superficies altamente contaminadas provocan una proliferación orgánica en las placas de RODAC.

La calidad microbiológica del aire ha de verificarse por lo menos dos veces a la semana, para asegurarse de que el medio ambiente del laboratorio no es una fuente importante de contaminación. Un sistema sencillo pero eficaz de verificar la calidad del aire es el denominado procedimiento de sedimentación o técnica de la placa de polvo residual. En varios lugares del laboratorio se exponen placas de un soporte no selectivo, como por ejemplo el agar, a la acción del medio ambiente. La elección de los lugares depende de factores tales como el tránsito de personas o la magnitud relativa de la actividad de análisis. Después de un período de exposición de 15 minutos, las placas se encierran en la incubadora a 35° durante 48 $\pm$ 2 horas. A continuación se procede al recuento de las placas y los resultados se anotan en un libro de registro, de tapas duras. Más de 15 colonias en las placas es una indicación de que la calidad microbiológica del aire puede no ser apta para la realización de análisis de laboratorio. En tal caso, deberá suspenderse la actividad del laboratorio, desinfectarse todas las superficies, y evaluar de nuevo la calidad microbiológica del aire antes de reanudar las operaciones normales del laboratorio. Para los laboratorios que deseen un procedimiento más perfeccionado existen varios tipos de instrumentos de muestreo del aire ambiental, como tamices de muestreo, muestreadores divididos y muestreadores centrífugos, que se examinan en detalle en el Compendio de métodos para el examen microbiológico de los alimentos (2), de la American Public Health Association's (APHA).

3.3 Servicios de limpieza y mantenimiento

Los suelos, bancos y otras superficies del edificio deben limpiarse regularmente. También hay que limpiar las campanas extractoras de humo, los aparatos de extracción de polvo, el equipo y el instrumental de vidrio. Los congeladores y refrigeradores deben vaciarse y limpiarse de vez en cuando, sin poner en peligro la integridad del contenido. Puede ocurrir que el personal de limpieza, que no dispone de formación técnica, vacile en limpiar el equipo de análisis, por miedo a averiarlo. Por este mismo motivo, a los analistas quizás no les guste una limpieza muy escrupulosa. En este caso, la administración deberá disponer que los analistas se ocupen de la limpieza de su equipo, mientras que el personal de limpieza se encargará del resto del edificio. Así pues, deberá preverse un turno de limpieza para los analistas, y otro para el personal de limpieza.

Todas las superficies deben frotarse frecuentemente con un trapo húmedo. La ausencia de polvo en las estanterías es señal de una limpieza bien hecha. Los suelos deben fregarse con una bayeta húmeda y desinfectarse regularmente para evitar la acumulación de residuos, en los que puedan sobrevivir y proliferar las bacterias. El encerado regular da lugar a la acumulación de cera sucia, sobre todo en las tablas de rodapié, y por consiguiente no es recomendable.

Deben llevarse registros de las operaciones de limpieza, que permitirán verificar la observancia del programa de limpieza del edificio. Asimismo, deberá efectuarse de vez en cuando una comprobación directa del estado de limpieza del laboratorio.

Si se enceran los bancos de madera, la cera deberá rasparse periódicamente para evitar la acumulación de suciedad.

Hace falta un programa preventivo de desinsectación para combatir las moscas, cucarachas y otros insectos. Estos insectos se sienten atraídos en particular por grandes cantidades de alimentos almacenados. El almacenamiento prolongado de alimentos a granel, aunque en general no se recomienda, puede ser inevitable en los laboratorios reglamentarios que quizás deban retener durante largos períodos las muestras de un caso litigioso. La desinsectación puede correr a cargo del personal del laboratorio, o encargarse a una empresa comercial. Debe llevarse un registro escrito con indicación de las fechas de las operaciones de desinsectación.

3.4 Referencias

1. Weatherwax, J., y P.G. Martin. 1986. Manuales para el Control de Calidad de los Alimentos. 1. "The Food Control Laboratory", 2ª edición. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia.

2. American Public Health Association. 1984. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 2nd ed., M.L. Speck (Ed.). American Public Health Association, Washington, DC.

4. PERSONAL

En un laboratorio típico de microbiología de los alimentos hay dos clases de personal técnico, en general: los analistas, que llevan a cabo los análisis, y el personal auxiliar que, con la capacitación y supervisión adecuadas de los analistas, prepara los medios y las soluciones, limpia el instrumental y pesa las porciones para el análisis.

El personal auxiliar debe ser consciente de la importancia de su cometido y de la necesidad de informar a su supervisor de cualquier circunstancia que exceda de sus conocimientos, posibilidades o control. En este documento no examinaremos la capacitación del personal auxiliar, porque ésta corre a cargo directamente del supervisor, y las funciones suelen estar bien definidas. El presente examen se centrará en el analista, que puede transferir parte de sus conocimientos al personal auxiliar.

4.1 Selección y cualificaciones

La selección del personal debe basarse en un criterio simple: elegir al mejor candidato para cada puesto. Cada uno de los puestos de trabajo deberá estar escrito detalladamente en un documento. La descripción de puesto deberá constar de tres elementos. Primero, un párrafo de introducción en el que figure una descripción concisa del puesto, indicando exactamente el lugar que ocupa en la estructura orgánica general. Segundo, una descripción detallada de todos los deberes y responsabilidades del analista. Tercero, una indicación del grado general de supervisión del supervisor y la medida en que el analista podrá llevar a cabo su labor con independencia.

Algunos puestos de analista en un laboratorio de microbiología no requieren necesariamente una educación de nivel universitario. cuando se seleccione a los candidatos para esos puestos, deberá tenerse en cuenta la experiencia en el trabajo como sustituto de la educación formal, sobre todo si dicha experiencia se ha adquirido en la disciplina para la cual se convoca la vacante.

Además de los estudios y la experiencia, el candidato ha de ser físicamente capaz de llevar a cabo las tareas exigidas por su puesto. El candidato seleccionado ha de ser capaz de manejar frascos, probetas, placas y otros instrumentos con destreza y seguridad, hacer funcionar y encargarse del mantenimiento del equipo de laboratorio y poder permanecer de pie o sentado por períodos prolongados.

Debe considerarse también la personalidad del analista. Algunos puestos de analista son para trabajar en equipo, y en tal caso el analista ha de ser capaz de colaborar con sus colegas en la persecución de un objetivo común. En cambio, otros analistas trabajan con más independencia, con poco o ningún trabajo de equipo. La descripción de puesto debe contener una explicación específica de la clase de trabajo que llevará a cabo el titular, para evitar conflictos de personalidad.

El supervisor inmediato, que conoce perfectamente la índole del puesto y trabajará con el analista cotidianamente, debe participar en la selección final del candidato.

4.2 Capacitación

La capacitación debe organizarse de modo que permita alcanzar los objetivos del laboratorio en general. Un miembro del personal de categoría superior deberá encargarse de la capacitación. Las necesidades de capacitación podrán determinarse en función de los objetivos definidos del laboratorio. Deberán organizarse actividades de capacitación en la metodología analítica específica, de ordinario en el propio laboratorio, ya que no es probable que las organizaciones cercanas realicen la misma clase de trabajos. Habrá que velar también por que el personal de análisis adquiera una comprensión básica suficiente de los principios científicos de las operaciones que efectúen. Estos conocimientos tendrán que haberse adquirido en estudios formales, pero, de haber lagunas, éstas deberán identificarse y subsanarse mediante cursillos y seminarios, o con la lectura y el trabajo a domicilio. El nivel máximo de capacitación corresponde a la interpretación de los datos. Estos conocimientos se adquirirán probablemente mediante estudios informales a domicilio, según el caso.

Los objetivos generales de la capacitación podrían ser los siguientes:

1. Asegurar que los analistas aprenden a fondo las técnicas de análisis.

2. Asegurar que los analistas practican las técnicas de investigación del análisis y perfeccionan su capacidad interpretativa.

3. Asegurar que los analistas producen datos analíticos de precisión conocida, que sean significativos y contribuyan al logro de los objetivos del laboratorio.

Todo nuevo empleado deberá recibir una orientación general acerca de su nuevo lugar de trabajo, consistente en lo siguiente: información sobre los horarios de trabajo y la carga de trabajo, presentación a los colegas y al personal de administración, situación de la biblioteca, comidas, vacaciones, días de paga, situación de los laboratorios, procedimientos para la eliminación de los desechos o materias contaminadas, programa de seguridad y vestimenta adecuada para el trabajo de laboratorio.

Después de recibir la orientación general, el analista estará en condiciones de emprender un programa de capacitación científica. La capacitación del analista es responsabilidad de un supervisor o un analista superior. La capacitación deberá ser directa, o sea entre el instructor y el analista. La capacitación del analista deberá efectuarse en varias fases. Durante la primera fase el analista se familiarizará con todos los aspectos del programa de garantía de calidad, como el funcionamiento y mantenimiento del equipo, documentación y manejo de muestras, preparación de las fichas de trabajo de los analistas, etc. Según las dimensiones y el detalle del programa de garantía de calidad, este período de capacitación podrá ser de 2 a 4 semanas.

La segunda fase de la capacitación podría consistir en el examen de las técnicas generales de análisis, el empleo del equipo y la preparación de las soluciones, normas, medios, etc. Esta fase de la capacitación abarcará unas dos semanas.

La tercera fase es la más prolongada. En ella se estudian las técnicas específicas de análisis aplicadas en el laboratorio. Como mínimo, en todos los laboratorios de microbiología de los alimentos deben enseñarse los procedimientos para la identificación y/o enumeración de los siguientes organismos o grupos de organismos: microfloras aeróbicas totales (recuento estándar en placa, recuento aeróbico en placa y recuento mesofílico en placa), coliformes totales, coliformes fecales, Escherichia coli, Salmonella y Staphylococus aureus. Según cuales sean los productos examinados en el laboratorio, podrá hacer falta capacitación complementaria sobre lo siguiente: Campylobacter (aves de corral, cerdo y leche cruda), Yersinia enterocolitica (carnes refrigeradas, hortalizas frescas, pescado y mariscos y productos lácteos), Listeria monocytogenes (carnes, productos lácteos y hortalizas), Vibrio cholerae y Vibrio parahaemolyticus (pescado y mariscos), Shigella (hortalizas frescas) levaduras y mohos (nueces, especias, cereales y alimentos enlatados), Bacillus cereus (arroz, trigo y otros cereales), y Clostridium perfringens (carnes). Si el laboratorio se encarga del análisis de alimentados enlatados, el analista deberá aprender las técnicas para identificar los organismos deteriorantes de esos alimentos. La duración de esta tercera fase de capacitación dependerá de la medida en que se enseñen los diferentes temas.

Cuando enseñe estas técnicas analíticas, el instructor no deberá limitarse a demostrar el procedimiento, sino que explicará también las precauciones que deben observarse cuando se aplique un método y la necesidad de analizar inmediatamente ciertos productos, almacenamiento de muestras de laboratorio antes del análisis a una temperatura determinada, empleo de un suplemento para un medio disponible en el comercio, temperaturas o períodos insólitos de incubación y posible presencia de cepas atípicas en una placa de agar.

Además de las precauciones en la aplicación del método, el instructor debe poner bien de relieve sus limitaciones. Por ejemplo, es posible que un método no sirva para el análisis de todos los tipos de alimentos, no sea suficientemente específico o adolezca de una sensibilidad limitada.

Durante todas las fases del período de capacitación, el instructor y el alumno deben sostener frecuentes conversaciones diarias. En el período de capacitación debe demostrarse el "cómo" y el "porqué" de cada fase del análisis. Si el analista no hace preguntas durante el período de capacitación, el instructor deberá promover el debate pidiendo al analista que explique cómo ha entendido las diversas fases de la capacitación. Debe llevarse un registro de la capacitación, como el indicado en el anexo 1.

En resumen, la capacitación es el medio que permite al analista producir resultados de calidad aceptable. Por consiguiente, se trata de una actividad extremadamente importante del laboratorio, y las evaluaciones de los capacitandos son muy útiles para determinar los efectos y la eficacia de la capacitación. La evaluación deberá efectuarse mediante entrevistas individuales y el examen de los registros de capacitación, y podrá correr a cargo de un supervisor o un miembro del equipo de garantía de la calidad. Una o dos evaluaciones al año

serán suficientes, salvo que la capacitación haya sido particularmente intensiva. Los resultados de las evaluaciones deberán ponerse en conocimiento de la administración y discutirse con ésta, y servirán para identificar las modificaciones necesarias en el programa de capacitación, nueva capacitación de los analistas y reconsideración de los procedimientos de evaluación.

4.3 Rendimiento del personal

Consideraciones generales

El programa de garantía de calidad puede integrarse en un mecanismo formal destinado a examinar y evaluar el rendimiento del personal cada seis o doce meses, como mínimo. El examinador da el tono del examen, que el analista no habrá de ver como algo negativo o amenazador. La finalidad del examen no es sólo poner a prueba los conocimientos del examinando, sino que además debe servir para lo siguiente: determinar las necesidades de capacitación inmediatas y a largo plazo; crear un ámbito, que de lo contrario no existiría, en el cual el analista puede discutir de diversos problemas de su trabajo; dar la oportunidad al supervisor de reconocer, elogiar y documentar el rendimiento satisfactorio de los analistas, y ofrecer a ambas partes la oportunidad de proponer mejoras.

Programas de verificación de muestras

Un programa de verificación de muestras es un ensayo efectuado entre diversos laboratorios para determinar la eficiencia analítica de los participantes. Un laboratorio de referencia prepara muestras homogéneas de ensayo con niveles teóricamente iguales de analitos microbiológicos. Es esencial, para la validez del programa, que estas muestras de ensayo sean homogéneas. Las muestras de ensayo se envían a los participantes en el programa, pidiéndoles que empiecen sus análisis en una fecha determinada.

Es posible que, en su afán de dar una impresión favorable, algunos directores de laboratorio encarguen el examen de las muestras de ensayo a su "mejor" analista. Sabiendo que se trata de muestras de ensayo, el analista se empleará a fondo. O bien puede ocurrir que, para obtener una evaluación más exacta de la capacidad del analista, el supervisor o el director del laboratorio resuelvan no decirle que se trata de muestras de ensayo. Hay que advertir a los analistas que empiecen a trabajar en el laboratorio que deberán analizar esas muestras como parte del programa de garantía de calidad, para demostrar su capacidad en determinados análisis. Es importante que a lo largo del año se ofrezca al mayor número posible de analistas la oportunidad de analizar muestras de ensayo.

Los resultados (cuantitativos o cualitativos) de los análisis de las muestras de ensayo deberán enviarse a los laboratorios de procedencia para su evaluación estadística.

El laboratorio de procedencia calcula la media de los resultados de cada laboratorio; a continuación calcula la media de las medias de todos los laboratorios y determina la desviación tipo. Sobre la base de una distribución normal, el 95 por ciento de las medias para cualquier serie de resultados analíticos debería situarse entre +2 y -2 de las desviaciones tipo de la media de las medias. Un 5 por ciento, o 1 de cada 20, de las medias de los laboratorios

puede quedar fuera de estos límites. Si toda las medias quedan situadas dentro del margen de ± 2 de las desviaciones tipo, la desviación tipo quizás sea demasiado grande. Sólo de tanto en tanto debe registrarse una media con una desviación tipo de ± 3.

Para los procedimientos relativos solamente a los datos cualitativos el planteamiento es distinto. El laboratorio de procedencia envía un juego de muestras de ensayo, unas positivas y otras negativas, a cada laboratorio participante. En cada una de las muestras de ensayo positivas puede haber uno de varios niveles de analitos (alto, medio o bajo). No obstante, por lo menos una de las muestras de ensayo positivas debe contener un nivel del analito al cual se espera que la prueba distinga entre los resultados positivos y los resultados negativos, es decir, el límite inferior de determinación. Los analistas participantes examinan las muestras de ensayo y comunican sus resultados al laboratorio de procedencia, indicando si son positivos o negativos.

El laboratorio de procedencia coteja los datos de todos los participantes y clasifica las reacciones del modo siguiente:

a) Conforme. Una reacción en la que el analista encuentra el analito en las muestras positivas o no lo encuentra en las muestras negativas.
b) Positiva falsa. Una reacción en la que el analista comunica la presencia del analito en la muestra negativa.
c) Negativa falsa. Una reacción en la que el analista no encuentra el analito en la muestra positiva.

La presencia de reacciones discrepantes, como las positivas-falsas o las negativas-falsas, es causa de preocupación. Por ejemplo, la identificación microbiológica de patógenos en alimentos destinados al consumo humano es habitualmente cualitativa, ya que su presencia en niveles incluso muy bajos representaría una grave amenaza para la salud humana. En tal caso, la comunicación de una reacción negativa-falsa sería mucho más grave que un resultado positivo-falso.

Sin embargo, circunstancias extremas ajenas a la voluntad del analista pueden explicar la presencia de una reacción negativa-falsa. Si la reacción negativa-falsa se ha producido en una muestra microbiológica con un bajo nivel del analito, es posible que éste pierda su viabilidad entre el momento de la inoculación y el inicio del análisis. A diferencia de los analitos químicos, los analitos microbiológicos son relativamente inestables y su comportamiento en un alimento es más difícil de predecir.

Una reacción negativa-falsa puede deberse también a una distribución no uniforme del analito dentro de la muestra. Aunque el empleo de muestras homogéneas en un programa de ensayo de muestras sería ideal, en gran número de casos ello dista mucho de la realidad. La distribución uniforme de un analito es mucho más facil de conseguir en una matriz líquida que en una sólida. Es posible incluso que el analito no haya estado presente en una muestra que reciba un bajo nivel de inoculación, dando lugar así al resultado negativo-falso.

Con todo, los resultados negativos-falsos en las muestras que reciban un nivel medio o alto de inoculación del analito han de suscitar la preocupación del analista y del supervisor. Si no puede darse una explicación lógica de esos resultados, habrá que proceder a una ulterior capacitación del analista.

Aunque las reacciones positivas-falsas son menos graves que las negativas-falsas, no debe subestimarse su importancia. Cuando la proporción de positivas-falsas excede del 10 por ciento, los análisis son imposibles de interpretar por falta de confianza en la presencia o ausencia del analito (1).

Otro tipo de programa de ensayos entre laboratorios es el estudio en colaboración, con el que se miden los resultados de un método. El laboratorio de procedencia prepara muestras de ensayo homogéneas y las distribuye a los analistas de los laboratorios participantes. Trabajando independientemente, los participantes analizan las muestras de ensayo con el método que debe validarse y envían los resultados al laboratorio de procedencia. Los datos se analizan estadísticamente y los resultados del método se expresan en términos de exactitud, capacidad de reproducción y capacidad de repetición. Se proporciona una copia de los resultados a cada analista, para que conozca su rendimiento en comparación con los otros participantes en el estudio.

Si se observan deficiencias en el trabajo de un analista, en ocasión de un programa de muestras de ensayo o cualquier otro programa de verificación del rendimiento, el supervisor deberá impartir una nueva capacitación al analista.

4.4 Referencias

1. Committee on Interlaboratory Studies. 1988. Guidelines for collaborative study procedure to validate characteristics of a method of analysis. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71:160-162.

5. MUESTRAS

Hay varios tipos distintos de muestras, cada uno con una finalidad específica. Las muestras de encuesta proporcionan información acerca de las prácticas industriales en relación con un tema en particular. Una encuesta puede llevarse a cabo para determinar si existe un riesgo microbiológico en relación con un alimento o grupo de alimentos en particular. Las muestras para normas alimentarias proporcionan la información en que se basan las normas alimentarias. Las muestras oficiales son aquellas que, en los casos de infracción, sirven de base para acciones concretas ante los tribunales. El presente examen trata exclusivamente de esta última clase de muestras.

5.1 Responsabilidad de la muestra

Desde un punto de vista legal o reglamentario, es esencial disponer de un registro escrito que permita asumir la responsabilidad de la muestra. O sea, tiene que haber un registro oficial que responda de la integridad de la muestra entre el momento de su recolección y el de su utilización definitiva. En realidad, en las empresas grandes la muestra oficial no se entrega directamente al analista sino que se da a un custodio que es responsable de su manejo y almacenamiento. Sin embargo, en los laboratorios más pequeños el analista puede recibir directamente la muestra.

La forma que adopte el registro dependerá de las circunstancias. Puede tratarse de un registro bastante completo, como en el caso del registro de responsabilidad de la muestra empleado por la Food and Drug Administration de los EE.UU. (véase el Anexo 4), o de un modelo más sencillo. Si no se utiliza un sistema computadorizado, se recomienda un sistema de fichas mejor que un libro de registro, ya que las fichas permiten una mayor flexibilidad de agrupación, archivo y acceso. Hay un mínimo de datos que deben constar en una ficha. Estos datos pueden o no encontrarse en otros documentos muestrales (p.e., el informe sobre la recolección de muestras, la ficha de análisis, etc.), y constituyen un medio de seguir el recorrido de la muestra desde la fecha de recolección hasta su destino final. El mínimo de datos e información que deben figurar en una ficha es el siguiente:

1. Número de la muestra.]
   ] (para identificar la ficha)
2. Nombre del producto.]

3. Fecha del muestreo.

4. Fecha de recepción en el laboratorio (importante para el registro de custodia).

5. Método de almacenamiento (en seco, refrigeración, congelación, etc.).

6. Lugar de almacenamiento (codificado para facilitar la localización).

7. Fecha de asignación al analista (necesario si no es la misma que la del análisis).

8. Analista a quien se ha asignado (el analista debe poner las iniciales cuando recibe la muestra).

9. Fecha de devolución (del analista).

10. Persona que ha efectuado la devolución (si no es el analista original).

11. Método y lugar del almacenamiento de reserva.

12. Eliminación o destino final de la muestra, método y fecha.

Todos los que reciben una muestra deben anotar el número, tipo y estado del envase o recipiente de la muestra (saco de papel, envoltorio de plástico, frasco de cristal, etc.). Si una muestra sufre desperfectos, o el recipiente está abierto, deberá notificarse inmediatamente de ello a la administración del laboratorio.

Durante todo el tiempo en que la muestra se encuentre en el laboratorio, deberá garantizarse su seguridad física, tanto si está encerrada en un armario como si la está manejando un analista.

5.2 Identificación e integridad

Cada muestra se identifica individualmente por un número de varios dígitos que corresponde exclusivamente a la muestra de que se trate. Normalmente, una muestra puede estar compuesta de varias subunidades o submuestras. Cada subunidad se identifica con un número o letra escritos en una cinta adhesiva impermeable. Esta misma serie de números o letras puede utilizarse para identificar subunidades de una muestra distinta. Cuando se toman varias submuestras de recipientes o cajas del lote, puede emplearse una combinación de números árabes y letras para identificarlos. Por ejemplo, si se toman dos latas (a y b) de cada caja de un lote, las latas podrán marcarse con los números 1a, 1b, 2a, 2b... para identificarlas como subunidades procedentes de las cajas 1, 2, etc.

La integridad de la muestra entre el momento de la recolección y el de la entrega al custodio o al analista del laboratorio de microbiología se garantiza mediante un precinto de un tipo u otro. En el Anexo 5 puede verse un ejemplo de precinto de papel. En este precinto el inspector o el funcionario encargado de la recolección pueden escribir el número de la muestra y la fecha, y firmar. Los precintos de papel se pegan al paquete que contiene la muestra de modo que no pueda abrirse en ningún punto sin que se vea que ha sido abierto o manipulado.

Cuando el paquete precintado llega al laboratorio, la persona que reciba la muestra verificará el estado del precinto. Si el precinto está roto, o hay indicios de una posible manipulación, habrá que notificar de inmediato a la administración.

Una vez el analista haya sacado la parte de la muestra que necesita para el análisis, la porción de reserva deberá devolverse al almacén, precintada. Es posible que la muestra de reserva deba almacenarse con más de un precinto. Si el precinto roto está adherido todavía a la muestra, el analista deberá procurar que dicho precinto permanezca visible cuando se proceda a un nuevo precintado. Esto constituirá una garantía de la continua integridad de la muestra.

5.3 Muestreo para análisis

Antes de extraer la parte de la muestra que va a analizar, el analista ha de asegurarse de que todos los registros estén en orden, que se haya mantenido la integridad de la muestra, que los recipientes de las muestras estén intactos y que el inspector haya recogido e incluido los adecuados controles de la muestra (que se examinan más adelante).

Cuando se recojan muestras microbiológicas con la técnica aséptica, el inspector o el encargado de la recolección deberán acompañar cada muestra sometida a análisis con cinco tipos de controles:

a) Recipiente estéril (sin abrir). Si se emplean recipientes estériles, deberá presentarse un recipiente sin abrir, esterilizado en las mismas condiciones que las muestras.

b) Recipiente esterilizado (abierto). Por lo menos un recipiente vacío, esterilizado en las mismas condiciones que las muestras, deberá abrirse y cerrarse en la zona de muestreo y presentarse junto con la muestra.

c) Guantes esterilizados desechables. Si se emplearon guantes esterilizados desechables para manejar el producto muestreado, deberá presentarse un guante no usado en un envase esterilizado.

d) Equipo esterilizado de muestreo (sin abrir). Si se emplearon instrumentos preesterilizados de muestreo (cucharas, espátulas, tijeras, cuchillos, etc.), deberá presentarse por lo menos un instrumento de muestreo no abierto de cada tipo.

e) Equipo esterilizado de muestreo (abierto). Deberá presentarse por lo menos un instrumento de muestreo de cada tipo, que haya sido abierto pero no utilizado en la zona de muestreo, en un envase esterilizado.

Estos controles deben examinarse microbiológicamente del mismo modo que las porciones de ensayo, y demostrarán si el procedimiento de muestreo aséptico influyó o no en el resultado del análisis.

Para efectuar el análisis, el analista extrae primero una porción de cada subdivisión de la muestra. Si el alimento es en polvo, molido o triturado, la subunidad deberá mezclarse a conciencia con un utensilio esterilizado antes de extraer la porción de ensayo. Las subunidades

de alimentos líquidos o semilíquidos en recipientes llenos pueden mezclarse rápidamente invirtiendo el recipiente 25 veces antes de extraer las porciones. Las subunidades de productos líquidos o semilíquidos en recipientes llenos a medias o en sus tres cuartos deberán agitarse 25 veces en un arco de 30 cm. durante 7 segundos. Las porciones para el análisis deberán extraerse inmediatamente después de efectuada la mezcla de las subunidades líquidas o semilíquidas.

Es preferible no descongelar las subunidades congeladas antes del análisis. Sin embargo, si hay que descongelar o templar una subunidad congelada para obtener las porciones, podrá procederse a la descongelación durante 18 horas a la temperatura de 2-5°. Si hace falta una descongelación más rápida, la subunidad podrá descongelarse a menos de 45° durante 15 minutos. La descongelación rápida debe efectuarse con una agitación continua en un baño maría termostáticamente controlado. El producto no debe sacarse del envase para facilitar la descongelación.

Una vez se hayan obtenido las porciones para el análisis microbiológico, pero antes de dar comienzo a éste, el analista ha de decidir si analizar las porciones individual o colectivamente, como un cuerpo compuesto. No obstante, las porciones para el análisis microbiológico suelen examinarse individualmente, con muy pocas excepciones, sobre todo si han de enumerarse o cuantificarse los microorganismos.

5.4 Almacenamiento y eliminación de las muestras

Entre el momento de la llegada al laboratorio y el del inicio del análisis, las muestras de alimentos perecederos no congelados deben mantenerse a una temperatura de 0 a 4°, y los alimentos congelados deben mantenerse en ese estado. todas las muestras perecederas o congeladas deben examinarse a las 36 horas de haber sido recogidas. Las muestras perecederas que no puedan examinarse dentro de las 36 horas siguientes a su recolección deberán congelarse. Sin embargo, la congelación repetida de muestras microbiológicas puede causar daños a las células microbiales, e incluso la muerte. Por consiguiente, a esta práctica solo se debe recurrir en último término, y nunca de manera habitual.

Para las muestras microbiológicas de mariscos no congelados deben aplicarse medidas especiales de conservación (1). Las muestras de mariscos no congelados deben examinarse dentro de las 6 horas siguientes a su recolección. No deberán examinarse las muestras conservadas a 0-4° durante más de 24 horas.

Los alimentos no perecederos, enlatados o secos, podrán almacenarse a la temperatura ambiente antes del análisis.

Después de que se hayan extraído de la muestra las porciones de ensayo, la muestra de reserva se devuelve al almacén. Según el tipo de alimento de que se trate, las muestras deberán almacenarse en las condiciones recomendadas en el Anexo 6.

Las porciones de reserva de muestras microbiológicas que contengan microorganismos patógenos y/o toxinas microbiales deberán tratarse en el autoclave antes de ser eliminadas. Las grandes masas de alimentos secos deberán someterse a tratamiento en el autoclave en cantidades más reducidas (0,5-1 kg), para que la adecuada penetración del vapor durante el tratamiento mate a todos los organismos patógenos viables. Deberá añadirse alrededor de 1 litro de agua por cada 500 g de alimentos secos para provocar una emisión suficiente de vapor durante el ciclo de esterilización. De ser preciso, la muestra seca de reserva podrá mezclarse con agua para disolver o desintegrar los grumos grandes de material sólido.

5.5 Embalaje y envío

De ordinario, el inspector o el encargado de la recolección son responsables del embalaje y el envío de una muestra de alimentos. No obstante, en ocasiones el analista tendrá que enviar una muestra a otro laboratorio para que confirme un resultado del análisis, o por cualquier otro motivo. Las muestras deben embalarse y enviarse de modo que su integridad no sufra merma. El envase, con el alimento que contenga, puede colocarse en un saco de plástico y precintarse con un sello de plomo o una abrazadera de metal. Los envases rígidos, como los frascos de cristal, pueden precintarse con un sello de cera, que podrá llevar una marca oficial.

Las muestras congeladas que hayan de expedirse deberán embalarse con hielo seco en cajas de cartón aisladas. La utilización de hielo seco requiere precauciones especiales: el hielo seco no debe manejarse sin protección manual, ni transportarse en un vehículo sin una ventilación adecuada, ni colocarse en envases herméticamente cerrados que pueden explotar por efecto de una presión excesiva; en el paquete deberá indicarse claramente el contenido de hielo seco, para que los transportistas tomen las precauciones necesarias. La congelación por hielo seco no surte efectos por más de 48 horas. Nunca hay que utilizar menos de 15 kg de hielo seco para un transporte de más de 12 horas. Las muestras de peso inferior a los 15 kg deberán embalarse con 15 kg de hielo seco; por cada medio kilogramo más de la muestra deberá añadirse un kilogramo de hielo seco. La cantidad de hielo seco habrá de ser mayor para los envíos que requieran un transporte más prolongado, o cuando el tiempo sea muy caluroso. En todos los embalajes en que se haya utilizado hielo seco, éste deberá distribuirse por igual, en la medida de lo posible. Si se han recogido subunidades en sacos de plástico, el hielo seco deberá ir envuelto en papel para evitar el contacto directo con el plástico. Las bajísimas temperaturas producidas por el hielo seco hacen quebradizo el plástico.

Como control de temperatura para demostrar que las muestras microbiológicas no se descongelaron en tránsito, un recipiente idéntico a los que contienen las subunidades de ensayo podrá llenarse hasta la mitad con etilenglicol. A la llegada al laboratorio, se tomará y registrará la temperatura de este control. Como indicador de la fusión podría incluirse también un saco hermético lleno de hielo desmenuzado.

Para enviar muestras perecederas refrigeradas, podrá utilizarse hielo normal o "hielo gel" comercial, en paquetes. Estos paquetes, que contienen un producto químico, deben colocarse en sacos de plástico sellados para proteger la muestra contra una posible contaminación, en caso de que el recipiente frigorífico se rompa durante el transporte.

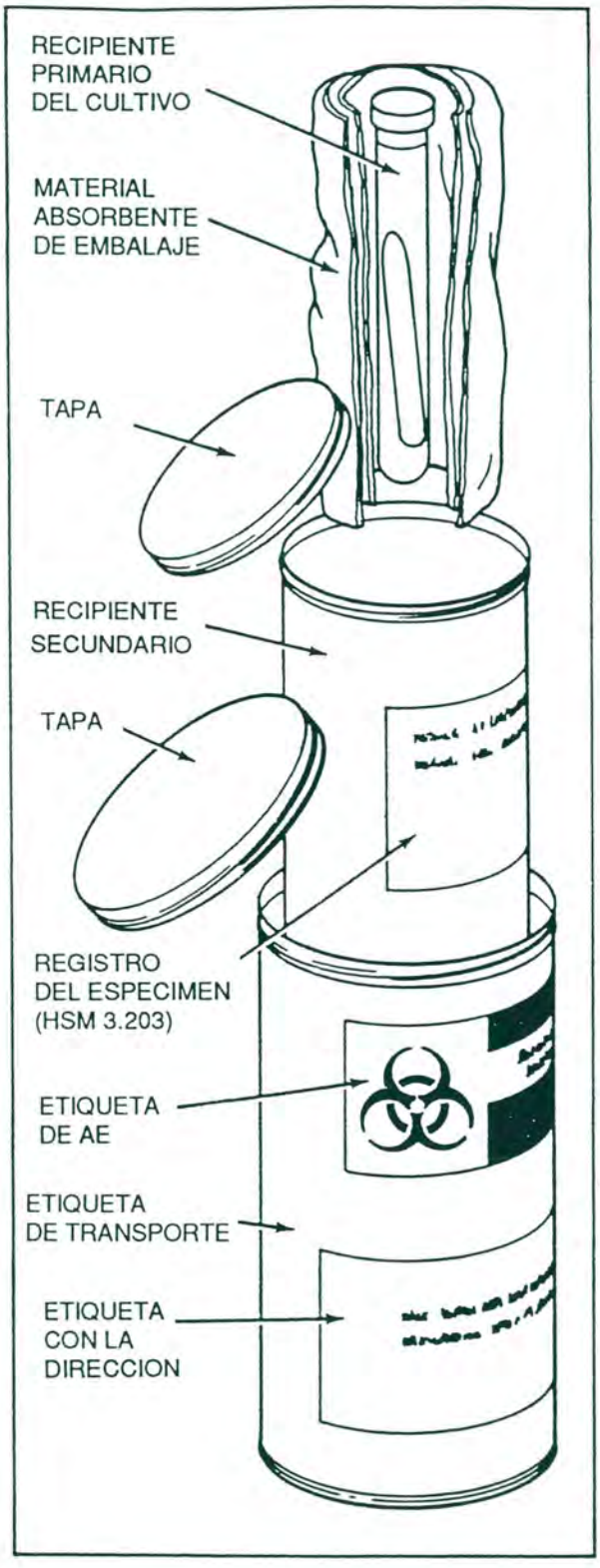
Deberán emplearse recipientes o cajas aislantes. Como control de temperatura que indique que no se rebasó la temperatura máxima durante el transporte, podrá añadirse agua en el mismo tipo de recipiente que el de las subunidades de ensayo. A la llegada del envío, se tomará y registrará la temperatura del agua.

Las muestras secas no perecederas deberán ir embaladas en una caja de cartón sólida, con el apropiado material de embalaje para evitar las roturas durante el transporte.

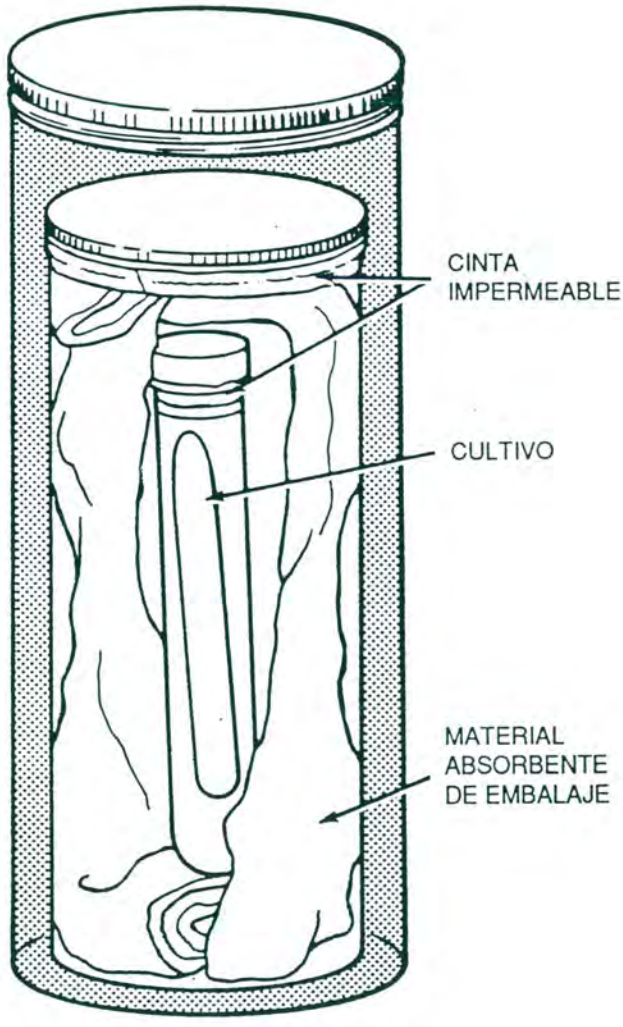
Las muestras deberán enviarse por el medio más rápido posible, y el transportista deberá avisar al destinatario de la llegada de las muestras.

El embalaje y expedición de agentes etiolóticos u otras materias biológicas requieren precauciones especiales. Una posibilidad sería embalar estos artículos en recipientes impermeables por dentro, para que el contenido no pueda salirse del recipiente. Cuando se envíen productos que no sean secos, el recipiente interno deberá recubrirse con material absorbente en cantidades suficientes para que se absorba completamente el contenido en caso de derrame del recipiente interno. A continuación, el recipiente o recipientes internos del líquido o el semilíquido y el material de relleno se encerrarán en un recipiente externo precintado impermeable, que puede servir también de recipiente de transporte.

El procedimiento de transporte de cultivos recomendado por la American Type Culture Collection (2) es el siguiente (véase el Gráfico 1): el cultivo está en un tubo biselado (de plano inclinado) con tapón de rosca (recipiente primario), sellado con cinta adhesiva. El tubo está bien protegido con material de embalaje absorbente, dentro de un recipiente secundario con tapón de rosca sellado también con cinta adhesiva. El recipiente secundario va en el interior del recipiente de transporte, protegido con material de embalaje absorbente. El tapón está enroscado y en la parte exterior del recipiente de transporte se fija una etiqueta con la dirección, y otra que advierte de la presencia de agentes etiolóticos.



EMBALAJE Y ETIQUETADO DE AGENTES ETIOLOGICOS



CORTE TRANSVERSAL
DE UN EMBALAJE CORRECTO

Gráfico 1

5.6 Referencias

1. American Public Health Association. 1985. Laboratory Procedures for the Examination of Seawater and Shellfish, 5th ed., A.E. Greenberg y D.A. Hunt (Eds.). American Public Health Association, Washington DC.

2. ATCC Quality Control Methods for Cell Lines. 1985. R.J. Hay (Ed.). American Type Culture Collection, Rockville, MD.

6. EQUIPO

6.1 Mantenimiento y reparación

Un equipo que funcione adecuadamente es esencial para la producción de datos microbiológicos fiables. A continuación figura una lista del equipo necesario para llevar a cabo análisis microbiológicos básicos, así como las instrucciones para su mantenimiento y reparación.

Incubadoras

La incubadora de aire es el aparato más comúnmente utilizado en el laboratorio de microbiología de los alimentos. Aunque la mayor parte de fabricantes afirman que la temperatura interna no resulta afectada por las fluctuaciones normales de la temperatura ambiente, algunos modelos pueden ser muy sensibles a los cambios de ésta, por leves que sean. Como el mantenimiento de una temperatura ambiente estable puede no depender siempre del analista, éste deberá estar atento a las fluctuaciones considerables de la temperatura ambiente, especialmente en los cambios de estación, para que puedan adoptarse las precauciones del caso. En el exterior de la incubadora deberá estar indicada claramente la temperatura que haya de mantenerse.

Algunas incubadoras de aire están equipadas con un dispositivo de control de la humedad relativa, a base de agua ablandada o parcialmente desionizada. Aunque muchos de estos dispositivos son de acero inoxidable anticorrosivo, no son a prueba de corrosión. Por lo menos una vez al mes deberá extraerse del termopar el termómetro húmedo, drenarse el dispositivo y limpiarse con agua fresca.

Todo derrame que se produzca dentro de la incubadora deberá absorberse y desinfectarse inmediatamente para evitar la subsiguiente contaminación. Por lo menos una vez al mes deberán limpiarse todas las superficies internas con una solución ligera de detergente, enjuagándolas y secándolas después cuidadosamente con un paño suave. En los puntos especialmente delicados deberá emplearse lana de fibra de acero inoxidable, y no simplemente lana de fibra de acero. Las manchas de grasa o de combustible pueden limpiarse con tolueno, un diluyente de nafta o un solvente similar. Si las superficies de acero inoxidable se decoloran por efecto de la oxidación, se aplicará a la zona afectada una solución de ácido nítrico al 20 por ciento y de ácido hidrofluórico al 1,5 por ciento, o bien una solución de ácido oxálico calentado al 2-5 por ciento. Transcurridos 1 ó 2 minutos la zona deberá enjuagarse con agua clara para extraer todo el ácido, y a continuación secarse cuidadosamente. Cuando utilice estas soluciones ácidas, el analista deberá protegerse las manos con guantes de goma, y ver que la habitación esté bien ventilada.

En todas las incubadoras los recipientes deben estar etiquetados claramente con el nombre del analista y la fecha y hora en que se depositó el recipiente en la incubadora. Las materias que hayan permanecido mucho tiempo en la incubadora por inadvertencia deberán extraerse, someterse a tratamiento en autoclave y eliminarse.

Baños maría

Los baños maría termostáticamente controlados deben emplearse en todos los casos en que la temperatura haya de mantenerse dentro de un margen de tolerancia de 0,1°. La tapa del baño maría debe estar bien ajustada para impedir una excesiva evaporación de la humedad.

La principal tarea de mantenimiento consiste en impedir o retrasar los daños causados por la corrosión. Los baños deben inspeccionarse frecuentemente, porque el efecto no controlado de la corrosión podría dañar, en último término, la bomba de agua y otras piezas. Si transcurren más de dos semanas entre dos utilizaciones, el baño deberá drenarse, lavarse con un detergente ligero y secarse cuidadosamente con un paño suave. Mientras estén en funcionamiento los baños podrá utilizarse un inhibidor de la corrosión en el agua. En los baños sólo debe emplearse agua destilada.

Refrigeradores y congeladores

Un laboratorio de microbiología de los alimentos debe disponer de un refrigerador mantenido a la temperatura de 4°, y un congelador mantenido a la temperatura de -20°, para el almacenamiento de muestras, especímenes, medios, sueros, reactivos y cultivos. La temperatura a la que deben mantenerse los refrigeradores y congeladores habrá de indicarse en el exterior de éstos.

El exterior de estos aparatos deberá limpiarse con un trapo húmedo por lo menos una vez al mes. El compartimento de congelación del refrigerador deberá descongelarse cada 3 meses, limpiándose todas las superficies internas. El congelador deberá descongelarse cada 6 meses, limpiándose también todas las superficies internas. Tanto en los refrigeradores como en los congeladores deberá instalarse un sistema de alarma que advierta de las temperaturas excesivamente altas. Todos los recipientes depositados en los refrigeradores y los congeladores deberán llevar etiquetas con la siguiente información: identidad de la materia, nombre del responsable y fecha de depósito de la materia en el refrigerador o congelador.

Autoclaves

El autoclave es esencial para esterilizar la mayoría de los soportes microbiológicos. Debe ser de tamaño suficiente para esterilizar los soportes sin hacinamientos. El empleo de un autoclave vertical, o de carga superior, no se recomienda en general por el inevitable hacinamiento y por la dificultad en ajustar y mantener una temperatura adecuada de esterilización. Es preferible siempre utilizar un autoclave de tipo horizontal, o de carga lateral, sobre todo en los laboratorios que manejan grandes cantidades de muestras. El autoclave ha de ser capaz de mantener una temperatura interna de 121° bajo una presión de 1 baria (15 psi); ha de estar equipado con un termómetro calibrado para medir la temperatura dentro de la cámara de esterilización con un manómetro de presión y con válvulas de seguridad directamente conectadas al tubo de suministro de vapor saturado, y ha de ser capaz de alcanzar la temperatura deseada en 30 minutos. Asimismo, el autoclave deberá ir equipado con un termógrafo que proporcione un registro permanente del ciclo de esterilización.

El autoclave debe destinarse primordialmente a la esterilización de los medios y las soluciones. No se recomienda esterilizar los cuentagotas y otros instrumentos calibrados de vidrio, porque la humedad acumulada afectaría la capacidad de vertimiento de los instrumentos.

Las reparaciones o ajustes del autoclave efectuados por personal poco experimentado pueden dar lugar a graves averías y costosas reparaciones. Las reparaciones sólo deben efectuarlas profesionales que conozcan perfectamente el aparato. De lo que si puede, y debe, ocuparse el personal del laboratorio es de las operaciones corrientes de mantenimiento.

Debido a las diferencias existentes entre los diversos modelos de autoclaves, aquí nos limitaremos a dar algunas instrucciones generales de mantenimiento. Las operaciones de mantenimiento pueden clasificarse con arreglo a su periodicidad: diarias, semanales, mensuales y trimestrales.

Hay dos operaciones que deben efectuarse cotidianamente. Primero, el registro diario de la temperatura debe sacarse del mecanismo de impresión y almacenarse o archivarse según proceda. Segundo, el interior de la cámara de esterilización debe limpiarse todos los días. Las superficies internas se limpiarán con una solución ligera de detergente, se enjuagarán con agua del grifo y se secarán con un paño sin borra. El filtro del desagüe de la cámara deberá extraerse, para limpiarlo de borra y de sedimentos. A continuación se lavará el reverso del filtro con un chorro de agua corriente y se volverá a colocar en el desagüe de la cámara.

Tres tareas deben realizarse semanalmente. Primero, el desagüe de la cámara se lavará con agua a chorro, extrayéndose el filtro y enjuagándose el conducto con una solución caliente de fosfato trisódico (dos cucharadas por cada cuarto de agua). Después de transcurridos 5 minutos, el conducto de desagüe deberá lavarse con un chorro de agua caliente, colocándose de nuevo el filtro en el desagüe de la cámara. La segunda tarea semanal consiste en verificar las señales de control y el estado del aparato. Tras vaciar la cámara, se fijan los interruptores digitales para 1 minuto. A medida que se sucedan las diversas fases del proceso de esterilización, el tablero de control deberá observarse cuidadosamente. Si se apaga alguna señal, habrá que avisar a un técnico especializado. La tercera operación semanal consiste en lavar con agua a chorro el generador de vapor. Este procedimiento no es el mismo para todos los modelos, y habrá que seguir las instrucciones que figuren en el manual del fabricante.

Todos los meses deberán aplicarse una gotas de aceite pesado de máquina a la bisagra de la puerta de la cámara.

Hay varias tareas que deben realizarse trimestralmente. Primero, los accesorios de engrase de la puerta deben lubricarse con grasa a alta temperatura. Segundo, hay que inspeccionar las juntas de la puerta y, si se observan grietas o zonas frágiles, cambiarlas. Tercero, deberán verificarse las válvulas de seguridad de la cámara y el generador de vapor. Hay que comprobar, en cada válvula, la posible acumulación de herrumbre, costra de óxido u otras sustancias que pudieran impedir la apertura. Se recomienda un suministro de agua con una dureza máxima de 5 granos para los generadores de vapor, con objeto de minimizar la acumulación de óxido. Cada manecilla de la espita (o anillo de cierre) deberá accionarse varias veces. La manecilla deberá desplazarse libremente y volver a su posición de cierre después

de cada accionamiento. Después de dejar que la cámara y el generador de vapor alcancen la presión operativa, deberán verificarse las válvulas de seguridad para detectar posibles fugas. Un técnico especializado sustituirá las válvulas defectuosas. La cuarta tarea consiste en limpiar y descostrar el generador de vapor, según las instrucciones del fabricante.

Hornos de aire caliente

El horno de aire caliente se emplea para esterilizar la mayoría de instrumentos de vidrio del laboratorio. Debe de ser de tamaño suficiente para evitar el hacinamiento; ha de ser capaz de proporcionar temperaturas uniformes y debe ir equipado con un termómetro calibrado que registre con precisión temperaturas comprendidas entre 160°y 180°. Es preferible también que haya un termógrafo con el que pueda registrarse permanentemente el ciclo de esterilización. El mantenimiento de un horno de aire caliente es mínimo. Todos los meses deberán limpiarse las superficies internas con una solución ligera de detergente, enjuagarse con agua del grifo y secarse.

Balanzas

El laboratorio de microbiología debe estar equipado con dos balanzas de carga superior, una de ellas con una capacidad de 2 000 g y una sensibilidad de 0,1 g, y la otra con una capacidad de 100-200 g y una sensibilidad de 1 mg. Las operaciones de mantenimiento que debe llevar a cabo el analista son mínimas: reemplazar los matraces defectuosos y limpiar la funda de protección y los platillos de pesaje. Si se limpian simultáneamente dos o más balanzas, el analista deberá cuidar de no confundir los platillos de pesaje y los soportes de las diferentes balanzas.

Medidores de pH

Salvo que se indique otra cosa, el pH de los diluyentes, los medios rehidratados y otras materias deberá ajustarse mediante un medidor de pH, con preferencia a un papel indicador de pH. El mantenimiento de un medidor de pH es mínimo, y se limita a la limpieza de la funda y la cubierta protectora.

A diferencia del medidor de pH, los electrodos necesitan cuidados especiales. Todos los electrodos requieren un acondicionamiento inicial. La ampolla de vidrio de un nuevo electrodo sensor debe sumergirse por lo menos durante una hora en agua desmineralizada o ligeramente ácida, o en una solución reguladora de pH 4, para hidratar la membrana de vidrio sensible al pH.

Los electrodos deben enjuagarse siempre cuando se transfieran de una solución estándar a una solución de muestra. Aunque es preferible efectuar el enjuague con una porción de la solución siguiente, puede utilizarse también agua desmineralizada. Debajo de los electrodos se coloca un vaso y desde un matraz de lavado se proyecta sobre los electrodos un chorro de la solución de enjuague. Después de un enjuague a fondo, los electrodos se secan con papel de seda blando.

Los procedimientos de almacenamiento dependen del tipo de electrodo. Los electrodos de vidrio deberán almacenarse en una solución reguladora de pH 7 o en una solución ligeramente ácida. Los electrodos de referencia deberán guardarse en una solución de 0,1 M KCl, para que la juntura se mantenga húmeda y sin obstáculos. el nivel de la solución de relleno en el electrodo de referencia deberá mantenerse en todo momento por encima del nivel de las soluciones de ensayo y de impregnación para facilitar una presión frontal positiva, expulsando así la solución de relleno a través de la juntura. Los electrodos de combinación deben mantenerse en una mezcla de solución reguladora de pH 7 y 0,1 M KCl al 50-50 por ciento.

Mezcladores

La mezcla es quizás el procedimiento más habitual de preparar una muestra de ensayo. Con frecuencia la mezcla de alimentos causa derrames inevitables. Cuando se produzca un derrame, el exterior de la base del mezclador deberá desinfectarse inmediatamente para impedir la contaminación de otras muestras de ensayo o de los locales. Después de la desinfección, el exterior de la base del mezclador deberá lavarse con una solución caliente de detergente, y enjuagarse para evitar la acumulación de materias secas.

Campana de flujo laminar

Todos los procedimientos biológicos en que intervengan organismos patógenos, la introducción de medios estériles o el análisis de esterilidad de alimentos enlatados, deben realizarse bajo una campana de flujo laminar, de preferencia de flujo vertical. el filtro principal y el filtro de descarga de aire particulado de alta energía (HEPA) deben ser eficientes en un 99,99 por ciento, eliminando partículas de un mínimo de 0,3 µm de diámetro. El equipo estándar se compondrá de una toma de corriente eléctrica protegida contra las salpicaduras, un tubo de entrada de gas solenoide, una conexión para el tubo aspirante de vacío, un adaptador de descargas, un contador del tiempo transcurrido, y una lámpara fluorescente externa. Contrariamente a lo que podría ser la práctica corriente, no debe permitirse que las campanas funcionen indefinidamente o por períodos largos, como por ejemplo todo un fin de semana. Las campanas deben estar en funcionamiento solamente cuando vayan a utilizarse. Tampoco se recomienda el empleo de mecheros de laboratorio Bunsen, Fisher o de otro tipo dentro de la campana. El uso de estos mecheros puede provocar una columna vertical ascendente de aire más fuerte que el flujo descendente de aire esterilizado a través del filtro HEPA, privando así de eficacia a la acción de la campana.

Los filtros deben verificarse todos los meses para detectar las obturaciones o la acumulación de suciedad, y cambiarlos según sea menester. El tapón debe sacarse del tubo de desagüe y las lámparas fluorescentes han de limpiarse cada dos semanas con un paño suave humedecido con ethanol. Cada tres meses hay que poner a prueba las lámparas ultravioletas con un fotómetro. Si la lámpara emite menos del 80 por ciento de su intensidad programada, deberá cambiarse. Como los rayos ultravioletas no penetran, las campanas deben estar completamente vacías para que la lámpara ultravioleta sea eficaz. La lámpara ultravioleta debe encenderse 10 minutos antes de que se utilice la campana, y apagarse 10 minutos después de que se hayan completado los análisis bajo la campana.

Además de utilizar la lámpara ultravioleta para desinfectar las superficies internas de la campana, el interior de ésta deberá frotarse antes y después de cada uso con un líquido desinfectante. Se recomienda el empleo de desinfectantes distintos antes y después del uso, para obtener una eficacia bactericida máxima. La eficiencia de la desinfección puede comprobarse con el método de contacto directo del agar con organismos replicados (RODAC). El método de la placa RODAC se describe en el Anexo 3. Los resultados de las placas RODAC deberán anotarse en un libro de registro que contenga la siguiente información: fecha, lugar o zona de muestreo dentro de la campana, desinfectante utilizado antes de las operaciones con la campana, desinfectante utilizado después de las operaciones con la campana, recuento microbiológico y nombre del analista.

Microscopios

Muchos de los trabajos taxonómicos realizados en un laboratorio de microbiología se basan en el examen microscópico de las características morfológicas y las reacciones de coloración. Se recomiendan un microscopio compuesto y un estereoscopio. El microscopio compuesto será preferiblemente binocular, con un objetivo de inmersión en aceite de 1,8 mm, una subplatina movida por un engranaje de cremallera que transporta un condensador Abe con una abertura numérica de por lo menos 1,25, un diafragma iris, un espejo plano si la luz no es una parte esencial del microscopio, o bien montado en la base, una platina mecánica y oculares que proporcionen aumentos de 100X, 400X y 1000X. El estereoscopio será preferiblemente binocular, con luz propia y un aumento de 60X.

Los microscopios deben colocarse en una superficie exenta de vibraciones y no es recomendable cambiarlos de emplazamiento. Cuando no se utilicen, los microscopios deben cubrirse con una funda para el polvo. El pedestal del microscopio deberá limpiarse, cuando haga falta, con un trapo o una gamuza. Las superficies esmaltadas podrán limpiarse con un paño humedecido. Las manchas ligeras en la platina pueden quitarse con parafina líquida o con petrolato no ácido. Las lentes deben limpiarse después de cada utilización con papel para lentes y con un producto comercial de limpieza de lentes. Los objetivos deben limpiarse sin desmontarse.

Deberá concertarse un contrato de mantenimiento para que una compañía competente haga la revisión anual de todos los microscopios. El personal del laboratorio no deberá intentar hacer ninguna reparación de los microscopios.

Programa de mantenimiento y reparación

Ha de organizarse un programa formal preventivo de mantenimiento y reparación para todas las piezas principales del equipo del laboratorio de microbiología. La responsabilidad del mantenimiento y reparación de cada pieza se confiará a uno de los principales usuarios. El registro de las operaciones de mantenimiento de cada una de las piezas principales del equipo podría llevarse en un fichero aparte. Este registro deberá incluir la siguiente información: fecha de la operación, nombre y empleo de las personas que la hayan efectuado, naturaleza de la avería (en su caso), breve descripción de las características de la operación de mantenimiento o reparación y, si se quiere, costo de la operación. Las instituciones grandes pueden disponer de su propio servicio de reparaciones. las instrucciones o manuales de

funcionamiento de los principales aparatos deberán guardarse en un lugar de fácil acceso para todo el personal del laboratorio. Antes de emplear un aparato, el personal del laboratorio debe conocer a fondo su funcionamiento y mantenimiento.

6.2 Calibración

La calibración consiste en medir, comparar y ajustar el funcionamiento del equipo en relación con una norma aceptada. De ordinario se aplican ciertas tolerancias al funcionamiento, y el equipo que se calibre deberá funcionar en los límites de estas tolerancias para ser aceptable.

A continuación se examina la calibración del equipo básico de un laboratorio de microbiología de los alimentos.

Incubadoras

La temperatura interna de cada incubadora debe observarse con uno o más termómetros; el número de éstos dependerá del tamaño de la incubadora. Hay dos tipos generales de termómetros: los de inmersión parcial y los de inmersión total. Cada tipo debe emplearse según su diseño, y los dos deben inspeccionarse frecuentemente para detectar interrupciones en la columna de mercurio. Los termómetros de inmersión parcial sirven para medir la temperatura interna de las incubadoras de aire. Los intervalos de graduación no deben exceder de 0,1°. El termómetro de inmersión parcial debe estar sujeto en una probeta vertical que contenga agua por lo menos hasta el nivel de la marca circular. Con masilla o calafate se sellará herméticamente la boca de la probeta, con objeto de reducir la mínimo la evaporación. Se recomienda que en las incubadoras grandes verticales se coloque un termómetro de inmersión parcial en las estanterías superior, media e inferior.

Antes de su utilización, los termómetros de inmersión parcial deben calibrarse con un termómetro certificado por una organización oficial de normalización. En el Anexo 7 se describe un procedimiento para calibrar los termómetros de inmersión parcial. Todos los termómetros de inmersión parcial deben calibrarse una vez al año.

Baños maría

El segundo tipo general de termómetro, el de inmersión total, se utiliza principalmente para vigilar la temperatura de los baños maría. A diferencia del termómetro de inmersión parcial, en el de inmersión total no hay marcas circulares porque se emplea siempre en posición horizontal, completamente sumergido en el baño maría. Los intervalos de graduación de este tipo de termómetro no deberían exceder de 0,1°.

El procedimiento de calibración es más sencillo para los termómetros de inmersión total que para los de inmersión parcial. El termómetro no calibrado y el de referencia se sumergen totalmente, uno al lado del otro, en un baño maría circulante y termostáticamente controlado. La temperatura del baño maría se fija a un nivel igual o muy cercano al de la temperatura a la que se utilizará el termómetro. Después de un período de equilibración de 1 hora por lo menos, se toma la temperatura de los dos termómetros. Para determinar la temperatura

verdadera, se consulta el certificado de corrección del termómetro de referencia. El factor de corrección (la cantidad que debe añadirse o sustraerse a la lectura del termómetro que se está calibrando para obtener la temperatura correcta o verdadera) debe determinarse. Este factor de correción, y un número de identificación del termómetro, se escriben en una cinta adhesiva que se pega al termómetro de inmersión total recién calibrado, o cerca de éste. Estos datos de calibración deben anotarse en un libro que contenga el registro de las temperaturas. Todos los termómetros de inmersión total deben calibrarse anualmente.

Además del tipo y número apropiados de termómetros en cada incubadora o baño maría, conviene incluir un termógrafo que permita llevar un registro continuo (24 horas) de la temperatura. Al igual que los termómetros de mercurio, el termógrafo ha de calibrarse en relación con un termómetro de referencia adecuado. Para esta calibración, el termógrafo y el termómetro de referencia se colocan uno al lado del otro en un lugar donde no sea probable que se produzcan fluctuaciones de la temperatura. Después de un período de estabilización de 3 horas, se toma la temperatura del termómetro de referencia y la indicada por el termógrafo: la diferencia es el factor de corrección. A diferencia del procedimiento empleado con los termómetros de inmersión parcial o total, en los que se anota el factor de corrección en una cinta adhesiva, que luego, si procede, se pega al termómetro, el factor de correción no se pega al termógrafo, sino que éste se ajusta manualmente. En la parte posterior del termógrafo se encuentra un dispositivo de ajuste de la calibración, que se acciona de manera que el termógrafo registre la misma temperatura que el termómetro de referencia. Siempre que se utilice un termógrafo, habrá que procurar cambiar las hojas de registro de la temperatura para que no se superpongan las impresiones.

Refrigeradores y congeladores

La temperatura interna de los refrigeradores y congeladores debe vigilarse con termómetros de inmersión parcial calibrados en relación con un termómetro de referencia adecuado, de escala apropiada. Los intervalos de graduación de estos termómetros para bajas temperaturas no deberían exceder de 1°. El procedimiento de calibración es el mismo que el descrito para los termómetros de inmersión parcial. Los datos de calibración deben anotarse en un libro que contenga el registro de la temperatura. Todos los termómetros de bajas temperaturas deben calibrarse anualmente.

Autoclaves

Con excepción de las operaciones corrientes de limpieza y mantenimiento por el personal del laboratorio, antes descritas, las calibraciones o ajustes necesarios deberán encargarse exclusivamente a personal especializado. Es recomendable firmar un contrato anual de servicios de mantenimiento para el autoclave.

Hornos de aire caliente

La temperatura interna de los hornos de aire caliente debe vigilarse con termómetros especiales para altas temperaturas, que puedan medir temperaturas de hasta 200°. Los intervalos de graduación para este tipo de termómetros no deben exceder de 1°. Esos termómetros deben calibrarse en relación con un termómetro de referencia a la temperatura

de utilización, aproximadamente. Podría emplearse también un termómetro de cuadrante, a condición de que se haya calibrado en relación con un termómetro de referencia. Estas calibraciones deben repetirse todos los años. Los hornos de aire caliente deberán vigilarse para detectar "puntos calientes", comprobando la temperatura en diversos puntos del horno.

Balanzas

La exactitud de todas las balanzas analíticas de alta precisión deberá verificarse por lo menos cada tres meses, con una serie de pesos calibrados. Una balanza de una capacidad aproximada de 2 000 g deberá tener, a 200 g, una exactitud de 0,1 g, y una balanza de una capacidad de 100-200 g, una exactitud de 1 mg.

También convendría hacer un contrato para la limpieza y calibración anuales de todas las balanzas analíticas de alta precisión, a cargo de un representante de la empresa de fabricación. Las calibraciones anuales efectuadas por contrata deberán anotarse en un libro de registro o archivarse según convenga, si la empresa proporciona certificados de calibración.

Medidores de pH

Los medidores de pH deberán normalizarse antes de cada uso. Con esta finalidad pueden utilizarse soluciones reguladoras certificadas, que se encuentran en el comercio. Aunque estas soluciones se obtienen en incrementos de 1,00 para valores de pH de 1,00 a 11,00, las soluciones reguladoras más comúnmente utilizadas en los laboratorios de microbiología de los alimentos tienen valores pH de 4,00, 7,00 y 10,00. Es posible efectuar una normalización reguladora simple, para la que no hace falta una precisión máxima, o bien une normalización reguladora doble. Como los procedimientos de normalización varían según el modelo, no podemos dar aquí instrucciones detalladas para hacer esas calibraciones. Sin embargo, hay que observar algunas precauciones cuando se normalice una solución reguladora o se determine el valor pH en un modelo de medidor de pH; debe procurarse que en el electrodo haya un nivel suficiente de referencia de la solución de relleno, hay que dejar que todas las muestras y soluciones reguladoras alcancen la misma temperatura (salvo que se emplee un compensador automático de la temperatura) antes de efectuar ninguna medición, y hay que agitar la solución reguladora y la solución de ensayo con un agitador magnético mientras se efectúa la medición.

Mezcladores

Se recomienda utilizar un mezclador de tipo comercial que pueda mezclar a varias velocidades. Si bien el fabricante suele indicar las velocidades de rotación en revoluciones por minuto (rpm) los mezcladores deberán calibrarse trimestralmente con un tacómetro, preferiblemente fotoeléctrico, para medir el número real de rpm en cada nivel de velocidad designado. Los datos de la calibración deberán anotarse en un libro de registro con la siguiente información: fecha, número del mezclador, rpm medidas para cada nivel de velocidad y nombre del analista.

Campana de flujo laminar

No es necesario que el analista haga ninguna calibración.

Microscopios

Véase el Anexo 8.

6.3 Comprobaciones del rendimiento

Incubadoras

Para determinar el rendimiento de las incubadoras de aire se emplean mediciones de la temperatura y la humedad. La temperatura interna de las incubadoras se verifica leyendo los termómetros calibrados dos veces al día, por la mañana antes de empezar los análisis y por la tarde antes de dar por terminada la jornada de trabajo. Si se utiliza un termógrafo, bastará con una lectura diaria. Tanto las temperaturas corregidas como las temperaturas sin corregir se anotan en un libro de registro. También deberá recogerse información sobre el número de la incubadora, posición de las estanterías, fecha, hora, número del termómetro y nombre del analista. Si se emplea un termógrafo, las hojas de registro deberán guardarse en un archivo propio durante tres años por lo menos. Estas hojas deberán firmarse y fecharse cuando se metan o se saquen del termógrafo. Las incubadoras de aire deben mantener una temperatura interna comprendida en un margen de tolerancia de $\pm$ 2°, y preferiblemente de $\pm$ 1°.

El nivel de humedad de la incubadora se determina indirectamente cada tres meses calculando el porcentaje de pérdida de peso de las placas de agar incubadas en condiciones preestablecidas. Un sistema sencillo es el consistente en colocar placas cubiertas (15 x 100 mm) que contengan 20 ml de agar solidificado en varios lugares de la incubadora. Después de una incubación a 35° durante 48 $\pm$ 2 horas, se calcula el porcentaje de pérdida de peso del agar. Deberán anotarse los siguientes datos en el mismo libro de registro en el que se anoten las temperaturas: número de la incubadora, posición de la estantería, fecha y hora de comienzo de la incubación, peso de 20 ml de agar antes de la incubación, fecha y hora de terminación de la incubación, peso de 20 ml de agar después de la incubación, cantidad y porcentaje de la pérdida de peso del agar. Si el porcentaje supera el 15 por ciento, habrá que aumentar la humedad. Si la incubadora no lleva un humidificador incorporado, podrá mantenerse dentro del aparato una bandeja de agua a la vista.

Las incubadoras y las cámaras anaeróbicas deben contener los indicadores adecuados de anaerobiosis. En el comercio se encuentran tiras indicadoras, que deberán cambiarse diariamente.

Baños maría

La función primordial de un baño maría circulante, termostáticamente controlado, es mantener la temperatura a un nivel preciso especificado, con un margen relativamente pequeño de tolerancia, habitualmente de 0,1°. Aunque este tipo de baño puede emplearse a varias temperaturas elevadas, por lo general se utiliza a una temperatura de 44,5 ó 45,5°,

para confirmar la fecalidad de los organismos coliformes. Como el mantenimiento preciso de una de esas dos temperaturas es más crítico que el de las temperaturas habituales de las incubadoras de aire (p.e. 25, 35 ó 37°), se recomienda equipar los baños maría con termógrafos calibrados para vigilar continuamente la temperatura. Si ello no es posible, el rendimiento de los baños maría se determinará observando las temperaturas tomadas con termómetros calibrados de inmersión total a primera hora de la mañana y a última hora de la tarde, y 3 ó 4 veces durante el horario normal de trabajo. Tanto las temperaturas corregidas como las no corregidas se anotarán a pluma en el libro de registro junto con el número del baño maría, la fecha, la hora, el número del termómetro y las iniciales del analista.

Si no se utiliza un termógrafo, se verificará que la temperatura no exceda del nivel aceptado de tolerancia durante las horas de descanso mediante los cultivos microbiológicos adecuados, como los de Escherichia coli y Enterobacter aerogenes añadidos a los cultivos desconocidos (de ensayo). El baño maría funciona normalmente si el cultivo de E. coli produce gas, y el de E. aerogenes no lo produce, en tubos con soportes inoculados de EC incubados a 44,5 ± 0,1° ó 45,5 ± 0,1° (según las instrucciones del método que se emplee) durante 24 ± 2 horas. Si el E. coli no produce gas, ello quiere decir que la temperatura del baño maría ha aumentado hasta alcanzar un nivel inaceptable. La producción de gas por la E. aerogenes indica que la temperatura ha descendido excesivamente. Cuando los baños estén en funcionamiento deberá emplearse una nueva serie de estos dos cultivos a intervalos de 24 horas. Las reacciones de los cultivos se anotarán en el libro de registro en el que se hayan anotado las temperaturas.

Además de vigilar la temperatura, hay que velar por la uniformidad térmica en todo el baño maría. Mientras se utilicen los baños, por lo menos una vez al día deberá tomarse la temperatura en diversos lugares del baño maría. Si la temperatura en uno o más lugares excede del margen aceptado de tolerancia, habrá que comprobar la circulación del agua en todo el baño. A veces ocurre que los tubos de entrada y de salida de la bomba de agua quedan atrapados debajo de la plataforma de metal que sostiene las probetas incubadas, con lo que el chorro de agua es insuficiente, lo que a su vez puede hacer perder la uniformidad de la temperatura. Por consiguiente, la posición de los tubos de entrada y salida de la bomba de agua deberá comprobarse todos los días, cuando los baños estén en funcionamiento.

Refrigeradores y congeladores

Aunque el sonido de una alarma de altas temperaturas puede indicar un funcionamiento deficiente de un refrigerador o congelador, las temperaturas deben verificarse leyendo una vez al día los termómetros calibrados. Los refrigeradores de gran capacidad han de llevar termómetros en la parte superior, intermedia e inferior, mientras que para los refrigeradores o congeladores de tamaño doméstico bastará con un termómetro. Las temperaturas deberán anotarse en un libro de registro de la temperatura. En cada anotación deberá figurar la misma información que en el caso de las temperaturas de las incubadoras de aire, esto es, número del refrigerador/congelador, fecha y hora; el analista responsable deberá poner sus iniciales.

Autoclaves

El funcionamiento adecuado de un autoclave puede asegurarse por medios físicos y microbiológicos. Se recomienda que un especialista contratado al exterior haga lecturas del termopar en diferentes lugares de la cámara de esterilización, una vez al año. Sin embargo, los analistas del laboratorio deberán utilizar también un indicador microbiológico, como una ampolla de esporas de Bacillus stearothermophilus, o un termómetro de registro máximo para certificar las condiciones de esterilidad del autoclave en cada uso. Las cintas para la indicación de la esterilidad disponibles en el comercio deberán emplearse también en cada carga.

Hornos de aire caliente

El rendimiento de los hornos de aire caliente se determina midiendo la temperatura con un termómetro calibrado o un termógrafo. Deberá llevarse un registro en el libro correspondiente que indique la fecha, hora, número de la carga, duración de la esterilización, temperatura de la operación y operador, para cada uso. Se recomienda también el empleo de cintas indicadoras comerciales con cada carga.

Balanzas

La exactitud de las balanzas debe verificarse por lo menos cada tres meses con pesos calibrados. Si una balanza no responde a las especificaciones del fabricante, un representante de la empresa o un técnico especializado deberán efectuar los ajustes necesarios.

Medidores de pH

Con el uso continuo o con la edad la eficiencia de los electrodos se reduce, dando lugar en ocasiones a una respuesta lenta o eléctricamente ruidosa, o a que el medidor se salga de la escala. Esta pérdida de eficiencia puede deberse a la contaminación o la lixiviación de la membrana de vidrio, o bien a la obstrucción de la juntura porosa.

Para restablecer la eficiencia del electrodo deberá limpiarse la punta y otras superficies contaminadas. Las capas de proteína pueden quitarse con pepsina o con 0,1 M HCl. Para quitar los depósitos de materia inorgánica puede lavarse la punta del electrodo con ácido etilendiaminotetraacético. Para quitar las películas de grasa y de aceite, la punta del electrodo puede limpiarse con acetona, metanol, o éter dietílico.

Si después de una limpieza simple el electrodo no recupera sus niveles anteriores de rendimiento, las lecturas errátiles del medidor de pH pueden deberse a una juntura bloqueada u obstruida. Para desobstruir una juntura pueden emplearse los siguientes procedimientos: sustituir la solución de relleno, sumergir la juntura durante una noche en una solución de 0,1 M KCl, aplicar presión al orificio de llenado o limpiar por aspiración el extremo de la juntura, poner a hervir la juntura durante 10 minutos en una solución diluida de KCl o, como último recurso, raspar la punta con papel de lija nº 600.

Si estos procedimientos no consiguen restablecer la eficiencia del electrodo, deberá reacondicionarse y renovarse la membrana sensora mediante la inmersión alterna de la punta en 0,1 M HCl (15 segundos) y 0,1 M KOH (15 segundos) durante 3-4 ciclos. Si este procedimiento cíclico no restablece el rendimiento, podrá sumergirse la punta del electrodo en una solución al 20 por ciento de bifluoruro de amonio durante 3 minutos o al 10 por ciento de ácido hidrofluórico durante no más de 15 segundos. Advertencia: Estas soluciones de fluoruro son muy peligrosas, y deben manejarse con las adecuadas precauciones de seguridad. Después del tratamiento con fluoruro, el electrodo deberá enjuagarse con un chorro de agua del grifo, sumergirse un momento apenas en 5 N HCl para quitar los fluoruros y enjuagarse de nuevo con agua del grifo. A continuación el electrodo tratado se sumergirá durante 3-4 horas en una solución reguladora de pH 4, antes de poner a prueba su rendimiento. Si el medidor de pH no responde adecuadamente, deberá sustituirse el electrodo.

Mezcladores

Por desgracia, diversos manuales de métodos microbiológicos para los alimentos recomiendan velocidades distintas de mezcla. Tampoco hay acuerdo en lo concerniente a las especificaciones para la mezcla de alta y baja velocidad. Por ejemplo, la American Public Health Association (APHA) recomienda que los alimentos se mezclen a baja velocidad (8 000 rpm) para una determinación de placa de recuento estándar (1). En cambio, la Association of Official Analytical Chemists define la baja velocidad como 10 000-12 000 rpm (2). El Bacteriological Analytical Manual de la Food and Drug Administration de los Estados Unidos recomienda que se mezclen los alimentos a alta velocidad (18 000-21 000 rpm) para el análisis del Bacillus cereus (3), y sin embargo muchos laboratorios consideran que 14 000-18 000 rpm es una alta velocidad de mezcla. Si se especifica una velocidad de mezcla para el método que se esté empleando, ésta es la velocidad que deberá aplicarse; si no se recomienda una velocidad de mezcla en particular, los alimentos deberán mezclarse a la velocidad más baja que permita una homogeneización completa en un plazo razonable (1-2 minutos). La mezcla a velocidades excesivamente altas o por períodos demasiado prolongados puede ser perjudicial para los microorganismos sensibles al calor y afectar por consiguiente los resultados del análisis.

El rendimiento del mezclador se determina mediante la observación visual del homogenado después de la mezcla. La presencia de trozos grandes de alimentos no mezclados indica que deberá aumentarse la velocidad y la duración del mezclado para ese alimento, o bien que habrá que cambiar la posición de las cuchillas mezcladoras. No obstante, si el exterior del recipiente de mezclado es caliente al tacto, la velocidad/duración de la mezcla puede haber sido excesiva y deberá reducirse para el alimento de que se trate.

Campana de flujo laminar

El rendimiento de la campana de flujo laminar se verifica mensualmente exponiendo las placas de agar al aire durante 1 hora. Las placas se incuban a 35° y se examinan a las 24 y las 48 horas. La placa no debe contener ninguna colonia. Si una o más placas contienen colonias, deberá repetirse el ensayo para determinar si la contaminación se debe a un funcionamiento deficiente de la campana, o a la técnica del analista. Si tres ensayos sucesivos indican la presencia de contaminación, se supondrá que la campana funciona deficientemente

y se recurrirá a los servicios de un técnico especialista para que compruebe la intensidad de la corriente de aire y determine si hay agujeros en los filtros o en la campana. Los resultados de la verificación microbiológica deberán anotarse en un libro de registro, con la siguiente información: fecha y hora de la exposición de la placa, lugares precisos muestreados de la campana, recuentos microbiológicos (de haberlos) y nombre del analista. Las conclusiones del técnico especialista deberán anotarse en un libro de registro.

Cuando se instale una nueva lámpara ultravioleta, y a continuación cada tres meses, deberá verificarse la eficacia de la lámpara. Este procedimiento se describe en el Anexo 9.

Microscopios

Se considera que un microscopio funciona bien cuando la resolución de la imagen enfocada es clara y ofrece un contraste suficiente. En ocasiones la imagen puede aparecer borrosa porque la lente de objetivo no está bien montada, o hay polvo o aceite de inmersión en las lentes. Habrá que comprobar la montura de la lente de objetivo y limpiar las lentes con papel seda suave o papel de lentes humedecido con un limpiador comercial de lentes. Si la imagen todavía no está clara, convendrá dirigirse a un representante autorizado de la fábrica.

Los microscopios fluorescentes se utilizan en diversos procedimientos microbiológicos. La pureza del isotiocianato fluorescente, que suele emplearse para los ensayos de anticuerpos fluorescentes, varía del 30 al 100 por ciento en los productos comerciales (4). Idealmente deberían utilizarse colorantes de una pureza del 100 por ciento. Los colorantes de menor pureza podrán usarse si el peso empleado para etiquetar el componente proteínico del suero tiene en cuenta las impurezas, y si éstas no aumentan la coloración no específica. utilizando una escala de - a + + + + (véanse las especificaciones del rendimiento del suero, en la sección 7.4) deberían determinarse para cada uso las reacciones de los cultivos conocidos positivos y negativos a la fluorescencia. Las reacciones de menos de + + con un cultivo positivo indican un funcionamiento defectuoso del microscopio fluorescente o bien un lote defectuoso de antisueros etiquetados como fluorescentes. Reacciones positivas de cualquier grado con cultivos negativos indican reacciones no específicas indeseables con los antisueros.

6.4 Instrumental de vidrio

Los instrumentos de vidrio de un laboratorio deben estar fabricados con cristal de borosilicato de bajo contenido alcalino. Después de cada utilización deberán examinarse, descartándose los que presenten bordes mellados o superficies internas corroídas. En particular, las puntas de los cuentagotas deberán examinarse cuidadosamente, ya que una punta mellada hará que los volúmenes vertidos sean inexactos. Los golletes de los frascos de dilución deberán inspeccionarse para detectar la presencia de melladuras que puedan causar escapes o derrames del contenido de los frascos mientras el analista hace las diluciones.

Los tapones o cierres de plástico de los frascos de dilución o las probetas deben ser objeto de un tratamiento, si son nuevos, para eliminar los residuos de tóxicos. Estas piezas se esterilizarán dos veces en el autoclave mientras están sumergidas en agua destilada, o serán objeto de dos lavados sucesivos en una solución detergente caliente.

Como residuos ácidos o alcalinos podrían permanecer en los instrumentos de vidrio después del lavado, deberá verificarse el pH de varios instrumentos elegidos al azar, añadiendo una gotas de bromtimol azul al 0,04 por ciento, y observando la reacción cromática. Este colorante indicador es amarillo (ácido), azul-verde (neutral) o azul (alcalino) en la gama de 6,5 a 7,3 pH. La solución al 0,04 por ciento de bromtimol azul se prepara añadiendo 16 ml de 0,01 N NaOH a 0,1 g de bromtimol azul, y diluyéndolo a 250 ml con agua destilada.

Además de la reacción pH, el instrumental de vidrio lavado debe inspeccionarse todo los años para detectar posibles sustancias bacteriostáticas o bactericidas que puedan haberse adherido a la superficie. El procedimiento se detalla en el Anexo 10. Los resultados deberán anotarse en un libro de registro, con la siguiente información: fecha, nombre del detergente utilizado para lavar los instrumentos, fuente y lote o número de control de las cápsulas petri preesterilizadas, fabricante y número de lote del agar de recuento en placa, recuentos microbiológicos y nombre del analista.

La esterilidad de los instrumentos de vidrio del laboratorio deberá comprobarse regularmente. Las cápsulas petri esterilizadas pueden comprobarse de inmediato vertiendo agar en placas seleccionadas al azar, incubando las placas solidificadas y examinándolas para detectar la presencia de proliferaciones. La esterilidad de instrumentos tales como los utensilios de muestreo, frascos de dilución y cuentagotas puede verificarse enjuagando los instrumentos con una solución reguladora de fosfato Butterfield y filtrando los enjuagues a través de una membrana. El filtro de membrana se sitúa en un medio no selectivo y se incuba en las condiciones prescritas por el método. Las probetas esterilizadas pueden verificarse añadiendo caldo fluido de tioglicolato y observando las proliferaciones después de la incubación.

Todos los instrumentos de vidrio volumétricos deben reunir las condiciones establecidas por la American Public Health Association (APHA) (5). Los cuentagotas y los frascos de dilución deben cumplir las prescripciones de exactitud del NBS o una organización equivalente de normalización. Las marcas estampadas de calibración en los frascos de dilución, y las marcas en los cilindros graduados, deberán comprobarse con un cilindro certificado por el NBS. Pueden utilizarse instrumentos desechables de plástico, a condición de que se determine aleatoriamente, pero de manera regular, la prueba de toxicidad y la exactitud de la graduación.

6.5 Referencias

1. American Public Health Association. 1984. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 2nd ed., M.L. Speck (Ed.). American Public Health Association, Washington, DC.

2. Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15th ed., K. Helrich (Ed.). Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

3. U.S. Food and Drug Administration. 1984. Bacteriological Analytical Manual, 6th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

4. Bordner, R., J. Winter y P. Scarpino. 1978. Microbiological Methods for Monitoring the Environment. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH.

5. American Public Health Association. 1985. Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 15th ed. G.H. Richardson (Ed.). American Public Health Association, Washington, DC.

7. PRODUCTOS QUIMICOS/MEDIOS/REACTIVOS

7.1 Especificaciones y pedidos

Es preferible emplear medios deshidratados de origen comercial, para la uniformidad metodológica y para conveniencia del analista. Sin embargo, si en el comercio no se encuentra el medio deseado, habrá que fabricarlo a partir de sus diversos ingredientes.

Los métodos suelen describirse en términos genéricos (no comerciales), de modo que raramente se recomienda una marca particular. Sin embargo, en ocasiones puede recomendarse una marca que haya demostrado su superioridad sobre sus competidores, y emplearse en consecuencia.

Nunca deben hacerse pedidos de medios que equivalgan a más de un año de suministro. Los climas muy húmedos pueden causar una rápida aglutinación de los medios deshidratados abiertos, con los consiguientes efectos desfavorables para el rendimiento. Además, los medios alcalinos pueden absorber dióxido de carbono y alterar su pH. Siempre que sea posible, los pedidos de medios deberán hacerse exigiendo la indicación de la fecha límite de validez en el frasco. En las etiquetas de todos los medios deshidratados deberá figurar la siguiente información: fecha de recepción, fecha de apertura y fecha límite de validez. Si no se especifica esta última fecha el medio no deberá utilizarse más allá de un año después de la fecha de recepción en el laboratorio. Los medios que se hayan alterado visiblemente por descoloración, aglutinación o acumulación de humedad, deberán descartarse.

Los reactivos serológicos, como los sueros de tipificación, sirven de ordinario para identificar diversos microorganismos. Estos sueros se proporcionan casi invariablemente con una fecha límite de validez. En la mayoría de los laboratorios convendrá que los pedidos no sean por más de seis meses de suministro.

Los compuestos químicos se utilizan mucho como elementos de medios, agentes selectivos, indicadores y colorantes en diversos procedimientos microbiológicos. Como las impurezas químicas pueden inhibir o estimular la proliferación microbial, o producir una reacción inconveniente, sólo deberán emplearse los productos químicos que reúnan los requisitos de la American Chemical Society, o cualquier organización equivalente. Los colorantes de venta en el comercio deberán observarse cuidadosamente, por las considerables variaciones existentes entre los lotes en cuanto al porcentaje de colorante, complejo colorante, insolubles y sustancias inertes presentes. Sólo deberán utilizarse los colorantes certificados por la Biological Stain Commission, u otra organización equivalente. A diferencia de la mayor parte de los medios deshidratados, los productos químicos pocas veces se suministran con una fecha límite de validez. Por consiguiente, se recomienda no hacer pedidos de más de dos años de suministro.

Cada tres meses deberá efectuarse un inventario de los medios deshidratados, los sueros liofilizados y los productos químicos. Las materias que hayan excedido de su fecha de validez deberán descartarse. En ningún caso deberán emplearse materias caducas en investigaciones de importancia tan crítica como son los análisis de muestras oficiales

reglamentarias, análisis de muestras de control de calidad o acumulación de datos de investigación destinados a la publicación.

7.2 Preparación y empleo

Uno de los factores más importantes de la preparación de medios y reactivos microbiológicos es la calidad del agua utilizada (1). En todos los casos deberá emplearse agua destilada o, aún mejor, agua desionizada. Podemos señalar a título de ejemplo que los fluoruros, a veces añadidos deliberadamente al agua del grifo, no se eliminan con la destilación.

La American Public Health Association (APHA) publicó directrices (2) para la realización de ensayos destinados a determinar la idoneidad del agua que se utiliza en la preparación de medios y reactivos químicos. Estas directrices se reproducen en el Anexo 11.

Siempre que se abra un frasco de un medio deshidratado o un compuesto químico, o una ampolla de suero liofilizado, el analista deberá rubricar y fechar el frasco/ampolla. Los detalles de la preparación de todos los medios rehidratados y reactivos químicos deberán anotarse en un cuaderno. Para los medios rehidratados deberá anotarse la siguiente información: nombre del medio rehidratado, procedencia comercial, número del lote, nombre del preparador, fecha de la preparación, cantidad de medio deshidratado pesado, volumen de agua añadido, pH ajustado final antes del tratamiento en autoclave, y número y duración de los tratamientos en autoclave. Para la preparación de soluciones reactivas químicas deberá anotarse la siguiente información: lista de todos los compuestos químicos utilizados, procedencia comercial y número de los lotes de compuestos químicos, nombre del preparador, fecha de preparación, cantidades de compuestos químicos pesados y volumen de agua añadido.

En la preparación de medios rehidratados, el analista debe emplear recipientes de capacidad equivalente al doble por lo menos del volumen final del medio que se está preparando. Para evitar que el medio deshidratado se adhiera al fondo del recipiente de preparación, una cuarta parte aproximadamente del volumen total de agua deberá introducirse en el envase antes de que se añada el medio deshidratado. El contenido deberá agitarse para mojar el medio y formar una pasta. El volumen restante de agua se añadirá a la pasta en dos o tres dosis iguales. La mayor parte de los medios deshidratados se disuelven fácilmente agitándolos o aplicando un poco de calor; no obstante algunos medios, como por ejemplo el caldo de tetrationato o el agar de sulfuro de bismuto, contienen uno o varios ingredientes que son insolubles. Hay que procurar no calentar excesivamente el medio, porque la exposición a temperaturas elevadas durante un período prolongado podría degradarlo. Es posible que haya que agitar la mezcla frecuentemente, o incluso constantemente, para evitar que se caliente demasiado. Conviene utilizar una batidora magnética y una placa de calentar si se dispone de ellas.

Para la mayoría de los medios microbiológicos se especifica un valor final de pH. El pH del medio rehidratado debe determinarse con un medidor de pH, no un papel de pH, antes y después de la esterilización. Puede resultar necesario ajustar el pH con 1 N HCl o 1 N NaOH antes del tratamiento en autoclave, para conseguir el pH final después de éste, según especifique el método o el fabricante.

Cuando prepare reactivos químicos, el analista deberá determinar los volúmenes de todas las soluciones con frascos volumétricos. Una vez preparados, los reactivos se transfieren a un frasco de cristal de borosilicato para su almacenamiento. Cada frasco deberá llevar una etiqueta con la siguiente información: nombre de la solución, concentración, nombre o iniciales del preparador, fecha de preparación y fecha límite de validez.

La mayoría de los medios microbiológicos se esterilizan con un tratamiento en autoclave de 15 minutos a una temperatura de 121° y una presión de 1 baria (15 psi). Algunas sustancias sensibles al calor, como los carbohidratos o "azúcares", deberán tratarse en autoclave a una temperatura reducida, o por poco tiempo, o ambas cosas a la vez. Los medios rehidratados no deberían someterse normalmente al tratamiento en autoclave en volúmenes de más de 1 litro. Con los medios que van en tubos podrán emplearse cierres de resorte. Los recipientes más grandes, como las botellas o frascos, deberán llevar un tapón de rosca o bien taparse no muy herméticamente con algodón, para que el vapor pueda penetrar durante el ciclo de esterilización. Como medida adicional de protección contra la contaminación posterior a la esterilización, los tapones de algodón deberán protegerse con un papel poroso antes del tratamiento en autoclave. Los tapones de rosca deberán aflojarse antes de introducir el medio en el autoclave, para que el vapor pueda penetrar en el contenido. Debe procurarse no cargar excesivamente el autoclave, porque ello impediría una circulación suficiente del vapor durante el ciclo de esterilización. En cuanto el manómetro de la cámara de presión indique cero después de la esterilización, el medio deberá sacarse del autoclave. Los tapones de los frascos deberán volverse a enroscar enseguida.

Después del tratamiento en autoclave y en enfriado, los tubos de medios con ampollas invertidas de fermentación deberán examinarse para verificar que no haya burbujas de aire falsas-positivas. Los medios de agar sometidos al tratamiento en autoclave que hayan de utilizarse en placas de vertimiento deberán calentarse a 44-46° antes de ser utilizados. Esta temperatura puede determinarse o controlarse colocando un termómetro en un frasco de agar expuesto a las mismas condiciones de caldeamiento y enfriado que los otros frascos del mismo tipo de agar. No debe emplearse agar fundido que se haya mantenido a 44-46° durante más de tres horas.

Deberá llevarse un registro de los tratamientos en autoclave en un libro aparte, con la siguiente información: número y duración de los tratamientos en autoclave (con referencia a los mismos datos del registro de preparación de medios), número del autoclave, período y temperatura de esterilización, operador y fecha. Los autoclaves empleados para la esterilización de los medios no han de ser los mismos que los utilizados para descontaminar las materias patógenas.

Algunos materiales sensibles al calor no pueden someterse a tratamiento en autoclave, sino que deben filtrarse. Los filtros no deben contener ninguna sustancia que ejerza una acción estimulante o inhibitoria en los microorganismos, ni ninguna materia que se interfiera con los sistemas de indicación bacterial en el medio. El 70 por ciento del filtro por lo menos ha de contener poros con un diámetro medio de $0,45 \pm 0,04$ µm. El fluido a través del filtro ha de ser como mínimo de 55 ml/min/cm^2 a 25°. Los filtros deben poder soportar el tratamiento en autoclave a 121° durante 10 minutos. Siempre que sea posible, la filtración deberá realizarse en una campana de flujo laminar o en un armario de seguridad.

Como algunos reactivos se autoesterilizan, no hace falta someterlos a filtración ni a tratamiento en autoclave. Algunas soluciones colorantes, por ejemplo, se preparan añadiendo agua estéril al colorante en un recipiente estéril, dejando que la solución se autoesterilice.

7.3 Duración útil y condiciones de almacenamiento

La duración útil de almacenamiento de los medios deshidratados y los sueros liofilizados viene determinada por la fecha límite de validez; en cambio, la duración útil de almacenamiento de los productos químicos orgánicos no se determina tan claramente. La práctica de no utilizar productos químicos dos años después de la fecha de recepción parece científicamente válida y económicamente justificada. No obstante, si se observan cambios en el producto químico antes de esa fecha, deberá descartarse. Las existencias de medios deshidratados, sueros liofílizados y productos químicos deberán someterse a rotación para reducir al mínimo las cantidades de materias caducas que deben descartarse. El contenido de los frascos abiertos de medios deshidratados deberá utilizarse dentro de los seis meses siguientes o descartarse. En los climas húmedos, puede ser necesario almacenar los frascos abiertos de medios deshidratados en un secador.

Los medios deshidratados y los productos químicos deberán almacenarse en lugares frescos y secos, protegidos contra la luz del sol o la iluminación artificial directa. Si hay espacio suficiente, los frascos de medios deshidratados deberán almacenarse en sus cajas de origen, para mayor protección contra la luz y el polvo. Los sueros liofilizados se almacenan normalmente con temperaturas de refrigeración, según las recomendaciones del fabricante.

Las directrices para determinar la duración útil en almacenamiento de los medios rehidratados, los sueros y las soluciones de reactivos químicos no están tan definidas como las de los reactivos deshidratados o liofilizados. Varios factores determinan la duración posible de almacenamiento de los medios rehidratados: el volumen del medio preparado, la temperatura de almacenamiento, el tipo y cierre del recipiente y la propia naturaleza del medio. El agar o el caldo en tubos de tapón de rosca herméticamente cerrados pueden almacenarse durante 3 meses a 4°. El agar o el caldo en tubos con cierres de resorte pueden almacenarse durante un máximo de 1 semana a esta misma temperatura. Los tubos refrigerados que contienen ampollas invertidas de fermentación deben examinarse a la temperatura ambiente para determinar si hay burbujas de gas falsas-positivas antes de la utilización. La pérdida de humedad en los tubos de caldo se determina marcando el nivel original del fluido en varios tubos de cada lote o medio recién preparado. Si la pérdida estimada excede del 10 por ciento del volumen original, los tubos deberán descartarse. Las placas de vertimiento con tapaderas poco ajustadas en sacos de plástico sellados podrán almacenarse durante un máximo de dos semanas a 4°, mientras que volúmenes grandes de agar en frascos o botellas de tapón de rosca herméticamente cerrados pueden almacenarse durante un máximo de 3 meses a esta misma temperatura. Todos los medios rehidratados sin excepción deberán protegerse contra la luz.

Las directrices antes expuestas no son aplicables a todas las situaciones. Por ejemplo, algunos medios selectivos podrían perder su selectividad con el tiempo, y deberán prepararse cuando son relativamente nuevos, o en el mismo día de la utilización, mientras que otros deben prepararse algunos días antes de ser utilizados. En esos casos las directrices recomendadas para el almacenamiento de medios preparados no son válidas.

Los sueros rehidratados no deben guardarse más de 30 días. A veces los sueros rehidratados se enturbian, o forman un precipitado. Estos sueros no deberán emplearse si no se aclaran primero y dan prueba de reaccionar adecuadamente con cultivos de control. Los sueros rehidratados no deben exponerse a la temperatura ambiente por períodos prolongados. Durante el almacenamiento, no hay que someterlos a congelaciones y descongelaciones repetidas, que son perjudiciales para la concentración del anticuerpo.

No hay directrices uniformes para el almacenamiento y la duración útil de las soluciones de reactivos químicos. Algunos reactivos han de prepararse el mismo día en que serán utilizados, mientras que otros pueden prepararse antes y almacenarse durante un cierto número de días, o incluso varias semanas; algunas soluciones reactivas deben almacenarse en un ambiente refrigerado, mientras que otras pueden almacenarse a la temperatura ambiente (24-26°). Hay soluciones que deben almacenarse en frascos herméticos con tapón de cristal, mientras que para otras esta precaución no es indispensable. Lo que sí es prescriptivo para todas estas soluciones reactivas es que no deben exponerse excesivamente al calor o a la luz. En consecuencia, deberán observarse las condiciones de almacenamiento recomendadas por el método que se emplee. Si las condiciones no se especifican, habrá que prever los controles adecuados para garantizar un rendimiento suficiente de las soluciones reactivas químicas.

7.4 Especificaciones del rendimiento

Cada vez que se reciba en el laboratorio un nuevo lote de medios deshidratados, habrá que determinar su rendimiento en relación con las especificaciones referentes a las normas físicas y la productividad. En lo tocante a las normas físicas, los medios deshidratados deben ser secos y fluidos. La mayoría de los medios han de poderse diluir completamente en agua destilada, pero hay excepciones notables, como el caldo de tetrationato o el agar de sulfuro de bismuto. Cuando se rehidraten, la mayoría de los caldos deberán ser transparentes y traslúcidos, pero aquí también hay excepciones. El pH no ajustado debe ser relativamente próximo ($\pm$ 0,1 pH unidades) al pH final especificado por el fabricante.

La segunda especificación del rendimiento, la productividad, se determina comparando el rendimiento del nuevo lote (de ensayo) con el de un lote de referencia. La American Public Health Association (APHA) proporciona un lote de referencia de agar de recuento en placa para determinar si el lote de ensayo reúne las especificaciones de la APHA. Un lote de ensayo es aceptable si proporciona recuentos de $\pm$ 10 por ciento de los que se obtienen con el lote de referencia de agar (3).

Por desgracia, la APHA no proporciona lotes de referencia de otros tipos de agar, y el laboratorio tendrá que emplear otro procedimiento. En el caso de los agares no selectivos, se utilizan placas de vertimiento paralelas para la enumeración de los analitos adecuados del lote de ensayo y el lote que se está utilizando (lote de referencia) con un mínimo de cinco

muestras de ensayo positivas. Para minimizar el efecto de las variables deberá emplearse una sola fuente de agua pura y un solo lote de instrumentos de vidrio u otro material necesario. Después de que las placas se hayan incubado en las condiciones recomendadas por el método, se examinará el tamaño y la apariencia de las colonias, independientemente de los recuentos reales. Todo tamaño o apariencia atípicos de las colonias deberá anotarse. A continuación se hará el recuento de las colonias, reduciéndose los valores a logaritmos. Se calcula la diferencia, d, entre dos valores logarítmicos para cada muestra, incluido el signo + o el signo -. A continuación de determinar la media, d, y la desviación estándar, S_d, de esas diferencias. La S_d se determina con la siguiente fórmula:

$$S_d = \sqrt{\frac{\Sigma (x - \bar{x})^2}{n-1}}$$

siendo $\bar{x}$ cualquier valor observado; x la media de todos los valores observados y n el número de determinaciones. Entonces se calcula el valor t de Student con la siguiente fórmula:

$$t = \frac{\bar{d}}{S_d/\sqrt{n}}$$

Si el valor t no es superior a 2,78, los dos lotes no producirán recuentos muy distintos, y el lote de ensayo será aceptable, a condición de que el tamaño y la apariencia de las colonias sean típicos. Si el valor de t excede de 2,78, los recuentos dados por los lotes de ensayo y de referencia serán significativamente distintos entre sí, y el lote de ensayo no será aceptable. Los medios líquidos semiselectivos pueden ponerse a prueba de modo semejante mediante procedimientos de dilución a extinción, para comparar los lotes de medios nuevos con los lotes estándar.

La aceptabilidad de los lotes de ensayo de medios selectivos se determina de un modo algo distinto al adoptado para los medios no selectivos. Los medios líquidos se inoculan con organismos que se prevé proliferen, y con organismos que se supone que se inhibirán. Después de la incubación en las condiciones prescritas, se hace el recuento de cada organismo. Un lote será aceptable si los organismos que deben proliferar arrojan recuentos altos, y los que se supone se inhibirán arrojan recuentos bajos. La aceptabilidad de los medios selectivos sólidos se determina de modo análogo. El analito objetivo debe recuperarse en un número comparable al de un agar no selectivo apropiado. Los organismos que se supone se inhibirán están presentes en número muy reducido, si acaso.

Si en el laboratorio se emplean filtros membranosos, deberán cumplirse dos especificaciones microbiológicas. Primero, la media aritmética de cinco recuentos hechos por la técnica de filtración debe situarse en un $\pm$ 10 por ciento de la media aritmética de los recuentos de cinco placas de agar diseminado, utilizando los mismos volúmenes muestrales de ensayo y los medios de agar. Segundo, el filtro debe ser capaz de retener una suspensión de 100 ml de Serratia marcescens que contenga 1 x -10^3 células/ml (2).

Las especificaciones de los sueros comerciales se basan en la apariencia física de la materia rehidratada y en la intensidad de las reacciones de aglutinación con cultivos conocidos de control. El suero rehidratado ha de ser un fluido claro, de color entre ambarino y pajizo, sin precipitado. A veces puede ocurrir que una ampolla de suero rehidratado despida un olor fuertemente desagradable, pero por lo demás su aspecto será normal. Si este suero reacciona fuertemente con cultivos conocidos, ello quiere decir que puede utilizarse.

Según cual sea el organismo que se pone a prueba, las reacciones serológicas pueden implicar antígenes flagelares, antígenes somáticos (pared corporal), o ambos. La serología flagelar suele realizarse en una probeta, y el precipitado de una reacción positiva es fino, delicado y "nevoso". La serología somática se efectúa de ordinario en una platina de cristal, y el precipitado de una reacción positiva es áspero y granuloso. Las reacciones serológicas flagelares pueden necesitar hasta 1 hora, mientras que las reacciones serológicas somáticas son relativamente rápidas (1-2 minutos, según el organismo de que se trate). Las reacciones de aglutinación se cuantifican normalmente del modo siguiente:

+ + + +	todas las células se aglutinan
+ + +	el 75 por ciento de las células se aglutinan
+ +	el 50 por ciento de las células se aglutinan
+	el 25 por ciento de las células se aglutinan
±	< del 25 por ciento de las células se aglutinan
-	no se aglutina ninguna célula

Los sueros rehidratados que dan reacciones de aglutinación de menos de ++ con cultivos conocidos de control son inaceptables.

Las especificaciones para los reactivos químicos pueden aplicarse a agentes selectivos y a colorantes utilizados en los procedimientos microbiológicos. Las tinturas, los agentes superficieactivos, los antibióticos, las sulfamidas y las soluciones de iones metálicos se emplean comúnmente como agentes selectivos en muchos tipos de medios. La pureza y, por ende, la toxicidad de esos agentes selectivos varían según el fabricante e incluso según el lote de un mismo agente selectivo del mismo fabricante.

Hay dos sistemas para determinar la toxicidad relativa de los diversos agentes selectivos. Con el primer procedimiento, se inocula 1 ml de una dilución al 10^{-5} de un cultivo preenriquecido del analito objetivo, en tubos separados que contienen 10 ml del enriquecimiento selectivo hecho con el lote estándar y el lote de ensayo del agente selectivo. Después de la incubación en las condiciones prescritas, el número de organismos del analito objetivo en el medio selectivo de enriquecimiento se determina con la técnica del número más probable, o con la técnica del cultivo de placas en superficie. Si los recuentos obtenidos con el lote de ensayo equivalen por lo menos al 90 por ciento de los del lote estándar, el primero será aceptable.

El segundo sistema requiere un procedimiento de dilución a extinción. A partir de un cultivo del analito objetivo preenriquecido durante 18-24 horas, se inocula 1 ml de una serie de diluciones decuplicadas en volúmenes de 10 ml de medios de enriquecimiento selectivo que

contengan el lote estándar o el lote de ensayo del agente selectivo. Los tubos inoculados del medio selectivo de enriquecimiento se incuban en las condiciones prescritas y se asignan a los agar selectivos apropiados. Un lote de ensayo será aceptable si el analito objetivo se recupera del enriquecimiento selectivo hecho con el lote de ensayo a un nivel comparable o superior al del enriquecimiento selectivo que contiene el lote estándar del agente selectivo.

Pueden emplearse tinturas para colorear las esporas bacteriales, los flagelos y las paredes celulares, y facilitar la observación de ciertas reacciones de producción de enterotoxinas. A diferencia de las especificaciones de rendimiento para los agentes selectivos, las especificaciones para los colorantes no son cuantitativas sino, hasta cierto punto, subjetivas. Los cultivos de control con reacciones de coloración conocidas se colorean con las tinturas adecuadas. Si la característica morfológica que ha de detectarse (p.e., esporas) es fácilmente visible, el colorante es aceptable. Como una variación en las técnicas de coloración puede provocar la variabilidad de las reacciones de coloración, cualquier tintura que presente una reacción inicialmente inaceptable deberá someterse de nuevo a la prueba por el mismo analista y, de preferencia, por otro analista por lo menos. Conviene también volver a verificar la tintura utilizando otros cultivos de control.

7.5 Referencias

1. Geldreich, E.E., y H.F. Clark. 1965. Distilled water suitability for microbiological applications. J. Milk Food Technol. 28:351-355.

2. American Public Health Association. 1985. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 16th ed., A.E. Greenberg, R.R. Trussell and L.S. Clesceri (Eds.). American Public Health Association, Washington, DC.

3. American Public Health Association. 1985. Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 15th ed., G.H. Richardson (Ed.). American Public Health Association, Washington, DC.

8. ESTANDARES

Los estándares primarios de referencia son materias homogéneas con propiedades tales como identidad, pureza y potencia, medidas y certificadas por el National Institute of Standards and Technology, la Pharmacopeial Convention de los EE.UU., la American Society for Testing and Materials, u otra organización equivalente. Los químicos emplean estos estándares para preparar las normas operacionales de los análisis químicos y medicinales.

Aunque la microbiología es una ciencia relativamente menos rigurosa que la química, en los laboratorios de microbiología de los alimentos se utilizan estándares de referencia. Los microbiólogos emplean cultivos de referencia para determinar los medios que rinden adecuadamente desde el punto de vista cualitativo.

8.1 Especificaciones y pedidos

Los centros principales donde pueden obtenerse cultivos de referencia en los EE.UU. son los siguientes:

1. American Type Culture Collection
   12301 Parklawn Drive
   Rockville, MD 20852

2. U.S. Department of Health and Human Services
   Public Health Service
   Centers for Disease Control
   Atlanta, GA 30333

3. Difco Laboratories
   P.O. Box 1058
   Detroit, MI 48232

4. BBL Microbiology Systems
   P.O. Box 243
   Cockeysville, MD 21030

La American Type Culture Collection (ATCC) es, con gran diferencia, el principal proveedor de estos cultivos. Difco Laboratories y BBL Microbiology Systems son esencialmente empresas de distribución que obtienen la mayor parte de sus cultivos de ATCC. Los cultivos suelen estar liofilizados o congelados y después deshidratados al vacío (liofilizados), y cada cepa de cultivo de ATCC lleva su propio número de identificación o código de referencia. Los cultivos suelen secarse y liofilizarse en ampollas de vidrio, y se almacenan en refrigeración (4-8°) antes de ser utilizados.

Además de los polvos liofilizados, los distribuidores comerciales pueden suministrar cultivos de ATCC impregnados en discos de filtro. Tanto los cultivos liofilizados como los cultivos de disco de ATCC se suministran con una fecha límite de validez, después de la cual

no deben utilizarse. Cuando haga un pedido de estos cultivos, el analista deberá proceder a la rotación de las existencias. Además, cada tres meses deberá efectuarse un inventario de los cultivos de referencia que se encuentran en el comercio. Los cultivos que hayan rebasado la fecha límite deberán someterse a tratamiento en autoclave y descartarse.

8.2 Preparación y utilización

Los cultivos liofilizados se rehidratan rompiendo asépticamente el cuello de la ampolla, añadiendo el polvo a un medio no selectivo adecuado para la proliferación del organismo e incubando el cultivo rehidratado en las condiciones recomendadas para ese organismo. Con un asa de platino se extiende en estrías el cultivo sobre un agar para obtener colonias aisladas, y la placa se incuba en las condiciones prescritas por el método. A continuación el analista hace lo que desea con las colonias aisladas.

Para rehidratar los cultivos de disco, se extrae asépticamente con un fórceps estéril un disco de la ampolla y se coloca en un tubo que contiene una infusión de sesos y corazón o un caldo de soja y tripticasa. Se da vueltas al caldo hasta que el disco se haya disuelto por completo. El cultivo disuelto se extiende en estrías con un asa de platino sobre un agar adecuado para obtener colonias aisladas, y la placa se incuba en las condiciones prescritas por el método. A continuación el analista hace lo que desea con las colonias aisladas.

8.3 Duración útil y condiciones de almacenamiento

Después de que los cultivos liofilizados o de disco se hayan rehidratado, el analista deberá mantenerlos como cultivos madre o de base. Las condiciones del mantenimiento varían para cada microorganismo; en el Anexo 12 se indican los procedimientos de mantenimiento de los organismos de mayor interés para el microbiólogo de los alimentos.

El analista debe llevar un registro que contenga la siguiente información: nombre del cultivo (género y especie), designación de la cepa, procedencia del cultivo (comercial u original, es decir, tipo de alimento o espécimen clínico a partir del cual se aisló originariamente el cultivo), fecha de recepción, fecha de rehidratación, todas las fechas de creación de subcultivos en serie a partir del cultivo madre rehidratado, todos los medios utilizados (proliferación, purificación y almacenamiento), período de incubación y temperatura de proliferación y purificación, temperatura de almacenamiento, localización del cultivo e iniciales del analista que lleve a cabo cada operación de mantenimiento.

8.4 Especificaciones de rendimiento

Los cultivos bacteriales de referencia deben reunir criterios de pureza, morfología, reacciones bioquímicas y reacciones serológicas.

Pureza

La pureza de los cultivos microbiológicos se determina extendiendo en estrías un caldo de cultivo en un agar de cultivo en placas adecuado, selectivo, no selectivo y/o diferencial. El agar selectivo contiene uno o más ingredientes que inhíben la proliferación de los

organismos no analitos, o competidores; no ocurre lo mismo con el agar no selectivo. El agar diferencial se limita a indicar cierta información bioquímica acerca del cultivo inoculado, mediante un cambio de color. Para garantizar la pureza de un organismo, es preferible utilizar a la vez un agar selectivo y un agar diferencial. Si no se dispone de un agar diferencial para el organismo de que se trate, podrá utilizarse un agar no selectivo.

La aparición de más de un tipo morfológico de colonia indica que el cultivo puede estar contaminado. Sin embargo, la presencia de diferentes tipos morfológicos puede deberse a mutantes, organismos violentados o dañados o medios defectuosos. En tal caso, deberán purificarse una o varias de las colonias de morfología típica. Para ello hay dos procedimientos:

Con el primero, las colonias escogidas se inoculan en el caldo apropiado, se incuban en las condiciones prescritas y se vuelven a extender en los agares de cultivo en placa. La ventaja de utilizar un caldo, especialmente no selectivo, es que da al organismo la oportunidad de resucitar, o revivir, y alcanzar una elevada densidad de población. Un inconveniente es que puede dar a organismos competidores la oportunidad de proliferar más allá del analito objetivo. En todo caso, si todas las colonias del agar de cultivo en placas son morfológicamente similares, puede suponerse razonablemente que el cultivo ha sido purificado.

Con el segundo procedimiento, las colonias escogidas se vuelven a extender directamente en los agares apropiados de cultivo en placa. La ventaja de volverlas a extender en forma directa, en lugar de inocularlas en un caldo y luego extenderlas nuevamente, es el ahorro de tiempo en la operación. Con todo, a veces es más difícil obtener colonias aisladas con este segundo método. Por otra parte, a los organismos tomados de una placa selectiva de agar les puede causar mucho estrés el hecho de extenderlos directamente en otra placa selectiva sin resucitación. En todo caso, si todas las colonias del agar de cultivo en placa son morfológicamente similares, puede suponerse razonablemente que el cultivo se ha purificado.

Morfología

Además de determinar la pureza del cultivo, la observación de la morfología de la colonia puede servir para verificar que los medios rinden suficientemente. Los organismos producen colonias que presentan una apariencia característica, o típica, en diversos agares. Una apariencia atípica puede indicar un medio defectuoso, o un defecto en su preparación. El analista debe mantenerse al corriente de la apariencia de las colonias extendidas a partir de un cultivo puro, que pueden haber sufrido una o varias mutaciones. Este tipo de cultivo puede contener organismos que produzcan colonias bastante diferentes. Varios organismos violentados o dañados en un cultivo por lo demás puro pueden producir también colonias morfológicamente distintas.

Reacciones bioquímicas

Una serie de reacciones bioquímicas permite confirmar la identidad de un organismo. En el procedimiento de identificación, deberían incluirse varios cultivos conocidos de referencia para garantizar que las pruebas bioquímicas se realizan adecuadamente. Se han documentado las reacciones individuales a los ensayos de estos cultivos de referencia (1-3).

Las reacciones bioquímicas típicas de los cultivos de referencia (convencionales o rápidas) indican si esos cultivos son puros y si las pruebas bioquímicas producen reacciones adecuadas. Una o varias reacciones bioquímicas atípicas de un cultivo de referencia indican que dicho cultivo está contaminado o ha sufrido una mutación, que la prueba bioquímica es defectuosa, o cualquier combinación de ambas causas.

El analista deberá tratar de determinar la causa de las reacciones bioquímicas atípicas, obteniendo y sometiendo a prueba diferentes copias de las mismas cepas de cultivos de referencia (p.e. otro subcultivo de P. vulgaris ATCC 13315); cultivos de referencia completamente distintos (p.e. Klebsiella pneumoniae ATCC 13883 o Enterobacter cloacae ATCC 13047, en vez de Proteus vulgaris ATCC 13315), lotes diferentes de substratos de ensayos bioquímicos convencionales, y lotes diferentes o códigos del fabricante de equipo de diagnóstico rápido.

Reacciones serológicas

Las reacciones serológicas son un complemento útil e indispensable de las reacciones bioquímicas para la identificación de organismos. Cuando se utilizan para la determinación definitiva de suerotipos, tanto los antígenes somáticos (pared corporal) como los antígenes flagelares se identifican serológicamente. En ambos casos se incluyen cultivos de referencia para determinar la intensidad y la especificidad de la reacción inmunológica.

Si se emplea una escala de 0 a ++++ (véase la sección 7.4) para el cálculo cuantitativo de la intensidad de la reacción de aglutinación entre un cultivo conocido de referencia (antígene) y su antisuero homólogo (anticuerpo), las reacciones de menos de ++ indicarán que el cultivo está contaminado, que el cultivo es puro pero puede contener antígenes flagelares o somáticos dañados, o bien que el antisuero tiene una concentración insuficiente o adolece de cualquier otro defecto.

Además de la intensidad de la reacción entre un cultivo conocido de referencia y su antisuero homólogo (p.e. el antígene Salmonella y el antisuero Salmonella), debe determinarse la especificidad de la reacción. La reactividad de un cultivo conocido de referencia se determina con antisuero no homólogo (p.e. antígene Escherichia coli y antisuero Salmonella). Las reacciones de cualquier grado de actividad, p.e. + o superior, indican que el cultivo de referencia está contaminado, o es puro pero contiene antígenes "bastos" o antoaglutinables, o que el antisuero es defectuoso.

Para garantizar que no se utilizan cultivos conocidos de referencia que sean bastos, o cultivos de ensayo desconocidos, cada determinación serológica deberá ir acompañada de un control de cultivo salino. Para este control, el propio cultivo deberá mezclarse con una pequeña cantidad de solución salina en una platina de cristal o en una probeta, según cual sea el tipo de determinación serológica que se haga. Una reacción positiva de cualquier grado indica que el cultivo es basto y no tipificable sin un tratamiento especial.

8.5 Referencias

1. Ewing, W.H. 1986. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, N.Y.

2. Krieg, N.R. 1984. Bergey's Manual of Systematic Microbiology, Vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

3. Sneath, P.H.A. 1986. Bergey's Manual of Systematic Microbiology, Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

9. METODOLOGIA

9.1 Elección del método

Los métodos deben elegirse en función de sus ventajas, las más importantes de las cuales son, desde el punto de vista técnico, las siguientes:

1. Exactitud, o ausencia de desviaciones o de error sistemático; la medida en que se aproximen a la respuesta verdadera.
2. Precisión, o ausencia de fluctuaciones en torno a la media.
3. Especificidad y falta de dependencia de la matriz.
4. Propiedades prácticas (gama de utilización, pertinencia, aplicabilidad).
5. Fiabilidad, resistencia, reproducibilidad.
6. Sensibilidad (respuesta por unidad de concentración).
7. Límite de detección.

Hay también consideraciones prácticas de rapidez, economía y simplicidad que deben tenerse en cuenta.

Los métodos de análisis microbiológico de los alimentos no escasean. La abundancia de métodos microbiológicos presupone que el microbiólogo debe elegir el método más apropiado, porque el empleo de métodos diferentes para analizar un determinado alimento puede conducir, y con frecuencia conduce, a resultados analíticos distintos.

Los microbiólogos deben conocer la finalidad y las aplicaciones de los principales manuales de análisis microbiológico de los alimentos. El más conocido quizás es el Official Methods of Analysis (Métodos oficiales de análisis) (OMA) de la Association of Official Analytical Chemists (Asociación de Químicos Analistas Oficiales) (AOAC) (1). Se trata de una compilación de métodos microbiológicos y químicos que han sido estudiados en colaboración, o sea que varios analistas, trabajando cada uno por su cuenta, obtuvieron resultados equivalentes utilizando un determinado método para analizar muestras idénticas de ensayo de un analito en particular. Un examen más pormenorizado del procedimiento de estudio en colaboración figura en la sección 9.3. Los métodos microbiológicos que fueron objeto de un estudio en colaboración con resultados positivos están descritos en OMA, Capítulo 46.

Otro manual de métodos microbiológicos, que no ha de confundirse con OMA, es el Bacteriological Analytical Manual (Manual de Análisis Bacteriológico) (BAM) de la Food and Drug Administration de los EE.UU. (USFDA) (2). La principal finalidad del BAM es "proporcionar a los laboratorios de campo de la USFDA métodos que han demostrado ser efectivos para la detección de microorganismos y sus productos en los alimentos". No se pretende que esos métodos sean los mejores, pero sí son los que utiliza la FDA para analizar las muestras reglamentarias oficiales. En varios casos los métodos de ambos manuales para analizar un determinado alimento con miras a detectar un analito en particular pueden ser iguales. Sin embargo, lo que diferencia a los dos compendios es que todos los métodos de la AOAC, por definición, son fruto de un estudio en colaboración, mientras que el BAM

contiene algunos métodos que no han sido objeto de un estudio de este tipo. Además, los métodos del BAM son aplicables a una mayor variedad de alimentos que los métodos recomendados por la AOAC.

La American Public Health Association (APHA) ha publicado un Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (Compendio de Métodos para el Examen Microbiológico de los Alimentos) (3), parecido a los compendios del AOAC y el BAM. Como este último, algunos de los métodos del compendio de la APHA han sido objeto de estudios en colaboración, pero no todos. Una diferencia importante entre el compendio de la APHA y los del AOAC y el BAM es el estilo de presentación. Ni el AOAC ni el BAM ofrecen muchas explicaciones de las fases analíticas de los métodos; en cambio, el compendio de la APHA proporciona información de base sobre los diversos procedimientos, indicando las precauciones que deben adoptarse y las limitaciones de cada procedimiento, facilitando ayuda en la interpretación de los resultados y aportando numerosas referencias conexas.

"Health and Welfare Canada" (Salud y bienestar del Canada) ha publicado también una serie de métodos para el análisis microbiológico de los alimentos (4). Estos métodos permiten la identificación y/o enumeración de una amplia variedad de microorganismos cuya presencia en los alimentos puede ser importante.

En su serie de manuales para el control de la calidad de los alimentos, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) ha publicado, con el número 4, un manual para el análisis microbiológico de los alimentos (5). Su finalidad consiste en proporcionar "un texto exclusivo de referencia sobre los métodos e informaciones que puedan ser de utilidad en los exámenes microbiológicos, en el control de calidad y en la vigilancia de los alimentos en los países en desarrollo". Este manual es de uso diario en los programas de calidad e inocuidad de los alimentos, y da prioridad a la aplicación de métodos prácticos. En la actualidad está en fase de revisión.

Otras varias organizaciones internacionales se interesan en los criterios microbiológicos de los alimentos, en relación con la salud pública en todo el mundo, así como en la preparación, estudio y normalización de los métodos microbiológicos empleados por analistas de diferentes países que participan en el comercio internacional. Entre esas organizaciones figuran la Comisión Internacional para las Especificaciones Microbiológicas de los Alimentos, la Comisión del Codex Alimentarius, el Comité de Expertos sobre Higiene de los Alimentos y el Comité Mixto de Expertos FAO/OMS sobre Higiene de los Alimentos, la Federación Internacional de Productos Lácteos y la Asociación Internacional de la Ciencia y la Tecnología de los Cereales.

Así pues, métodos no faltan; el problema es saber cuáles hay que emplear. Esta decisión suele tomarla la administración tras considerar factores tales como la fiabilidad, la rapidez y el costo, como hemos visto en la sección 1.1. Los métodos elegidos habrán de ser prácticos; no obstante, lo que es práctico para un laboratorio puede no serlo para otro. Por lo tanto, la practicidad y la aceptabilidad definitiva de cualquier método habrán de decidirse caso por caso.

Los administradores de laboratorios dedicados a la certificación microbiológica de las exportaciones han de considerar el método analítico particular que se emplee en el país al que se exportan los alimentos. Conviene siempre emplear el mismo método que utilice la autoridad reguladora del país destinatario del envío de alimentos. Así pues, el laboratorio de microbiología quizás tenga que emplear métodos distintos en un mismo alimento exportado a diferentes países.

9.2 Controles

Con frecuencia se pasa por alto la necesidad de aplicar los controles adecuados en los laboratorios de microbiología. Estos controles son necesarios para corroborar la validez de los resultados de los análisis.

Controles de muestreo

Véase la sección 5.2.

Controles analíticos positivos

Debemos considerar dos tipos de controles analíticos positivos.

El primero es el control del medio o del cultivo, que garantiza que éstos actúan adecuadamente. Se prepara inoculando el analito al medio inicial y aplicando el mismo procedimiento analítico utilizado con las muestras de ensayo. Este control debe mostrar también la apariencia típica del analito en cualquier agar de cultivo en placa que se utilice con este método.

El segundo tipo de control analítico positivo es el control de la muestra de ensayo (que no debe confundirse con los controles de muestreo), que sirve para la misma finalidad que el control de medios o cultivos. Los alimentos sometidos a este control se inoculan con el analito y se someten al mismo procedimiento analítico aplicado a las muestras de ensayo. Este control puede abarcar el control de soportes o cultivos y es preferible, porque se considera el efecto de la materia matriz del alimento en el rendimiento del medio.

No es necesario que el nivel del analito en los controles analíticos positivos se aproxime al nivel de sensibilidad del procedimiento, pero sí ha de ser suficientemente alto para garantizar la presencia de células viables del analito en el día que den comienzo los análisis.

Controles analíticos negativos

Deben considerarse tres tipos de controles analíticos; no obstante, el número de controles que se apliquen dependerá del tipo de análisis microbiológico.

El primer control, el control negativo del medio, permite verificar que el medio analítico no esté contaminado por el analito. El medio inicial no inoculado sigue todo el procedimiento analítico aplicado a las muestras de ensayo.

El segundo tipo de control analítico negativo, el control del cultivo, muestra la apariencia de los no analitos (como los organismos competidores) en los diversos medios o indica que los no analitos no proliferarán en los medios utilizados en el procedimiento de ensayo. Este control se prepara inoculando el no analito en el medio inicial y aplicando al medio el mismo procedimiento aplicado a las muestras de ensayo.

El tercer tipo de control analítico negativo, el control ambiental, ofrece una garantía razonable de que el medio ambiente no es una fuente del analito. Con unas pocas excepciones, este control se prepara exponiendo el medio inicial al aire libre durante todas las operaciones del primer día de análisis. Por ejemplo, puede tratarse de un frasco abierto de caldo de lactosa si lo que se quiere es identificar la presencia de Salmonella en los huevos secos en polvo, de un frasco abierto de caldo de soja y pripticasa para identificar la Salmonella en la levadura seca activa, de un tubo destapado de caldo de lauriltriptosa para la enumeración de coliformes, o de una placa de medio expuesto Baird-Parker para la enumeración de Staphylococcus aureus. No obstante, si el procedimiento tiene por finalidad la enumeración de la microflora aeróbica total en un alimento, la exposición de una cápsula petri de agar al aire libre no sería adecuada. En este caso un buen control ambiental consistiría en exponer una cápsula petri de 15 x 100 mm que contenga 20 ml de agar al aire libre durante 15 minutos. Si no proliferasen más de 15 colonias en la placa incubada, ello significaría que el medio ambiente del laboratorio es adecuado para llevar a cabo una determinación del recuento total en placa (véase la sección 3.2, Vigilancia del aire). Después del primer día de análisis, todos los controles ambientales negativos reciben el mismo tratamiento que las muestras de ensayo. El control ambiental negativo puede comprender el control negativo de los medios.

Controles de esterilidad del instrumental de vidrio

Véase la sección 6.4.

Controles de los cultivos en baño maría

Véase la sección 6.3, Baños maría.

9.3 Validación del método

Antes de que un método sea utilizado corrientemente en un laboratorio, es necesario que una organización exterior, y el propio laboratorio, la convaliden debidamente. La que es quizás la principal organización encargada de validar los métodos analíticos, la AOAC, tiene como objetivo primordial "obtener, desarrollar, probar y adoptar métodos uniformes, precisos y exactos para el análisis de los alimentos" (6). Para que la AOAC le confiera carácter oficial, el método ha de satisfacer tres criterios.

Primero, el método ha de facilitar datos de un grado predecible de precisión y exactitud cuando lo empleen analistas cualificados. La precisión da la medida de la variabilidad del método en un determinado laboratorio, y entre varios laboratorios. La exactitud indica el grado en que el método determina el verdadero nivel del analito.

El segundo criterio de validación de un método es el de su practicidad. Para satisfacer este criterio, el procedimiento ha de ser lo más rápido y sencillo que sea posible, sin dejar por ello de reunir los requisitos de fiabilidad. A veces puede ocurrir que el único método fiable de que se dispone no sea práctico, por su costo y por el tiempo que consume. En tal caso, la AOAC puede aceptar el método por razón de su necesidad. No obstante, entretanto los analistas deberán seguir buscando un método que sea a la vez fiable y práctico.

El tercer criterio es la disponibilidad del método. El método no debe contener un "secreto comercial" ni formar parte de un documento confidencial que no esté a la disposición de los analistas interesados. En la medida de lo posible la AOAC alienta la descripción de los métodos en términos genéricos o no comerciales.

Todo método que reúna estos criterios deberá someterse a un estudio en colaboración antes de que la AOAC lo reconozca como método oficial. El estudio en colaboración es el mecanismo empleado para validar oficialmente un procedimiento. Se trata de un estudio entre laboratorios en el que analistas competentes y experimentados, trabajando cada uno por su cuenta en diferentes laboratorios, emplean un método específico de análisis de muestras de ensayo homogéneas para un analito en particular. Su finalidad estriba en demostrar que un determinado método puede emplearse en varios laboratorios independientes para obtener resultados esencialmente equivalentes. Las directrices para la realización de un estudio en colaboración figuran en otra parte del presente trabajo (7).

Un laboratorio puede tener que realizar su propia validación de un procedimiento que se desea utilizar corrientemente, si no se ha validado aún ningún procedimiento para una determinación analítica en particular. En otros casos el laboratorio podrá optar por revalidar un método que ya haya sido validado por la AOAC u otra organización internacional. Existen varios motivos para proceder a una revalidación. Primero, el laboratorio puede querer asegurarse de que el método es aplicable al alimento que está examinando. Muchos métodos validados pueden aplicarse al análisis de un solo tipo específico de alimento o unos pocos. Si el método no es aplicable al alimento o alimentos que analice el laboratorio interesado, éste deberá realizar su propia validación del método de análisis de los alimentos de que se trate.

Segundo, un laboratorio desea determinar la especificidad del método. Por ejemplo, si un estudio en colaboración ha evaluado un método para identificar tres de más de 1 700 serotipos de Salmonella en determinados alimentos, un laboratorio puede querer verificar que el método sirva para identificar otros serotipos, o documentar el comportamiento de organismos distintos del Salmonella con el método.

Tercero, puede ser conveniente determinar si es posible que se planteen problemas al utilizar el método en un laboratorio en particular. Puede ocurrir que un estudio en colaboración, en condiciones de estricto control en el laboratorio, haya demostrado que el método es fiable, rápido y rentable, pero por alguna razón desconocida no puede utilizarse corrientemente en un laboratorio determinado.

Cuarto, el laboratorio quizás desee poner a prueba la capacidad del analista de utilizar el método. Si no se obtienen resultados aceptables, el laboratorio deberá emplear otro método igualmente aceptable o considerar la conveniencia de que al analista sea capacitado de nuevo.

Siempre que sea posible, el método que deba validarse se comparará con un método existente o estándar. Cuando lleve a cabo la validación o revalidación de un método, el analista deberá emplear alimentos que estén naturalmente contaminados por el analito deseado. Si no dispone de alimentos de este tipo, el analista deberá contaminar artificialmente los alimentos con el analito objetivo. cuando prepare las muestras de ensayo para un estudio de validación, el analista deberá considerar la conveniencia de emplear células de analitos sometidas y no a tensión; tipo y grado de la tensión (congelación, secado, calentamiento, radiación y clorinación); niveles de inoculación; inclusión de no analitos; uso de analitos atípicos, y número de las muestras de ensayo. Andrews (8) proporciona detalles sobre la preparación de muestras para los estudios en colaboración de procedimientos microbiológicos de los alimentos, de la AOAC. No obstante, estas mismas directrices son igualmente aplicables a la preparación de muestras de ensayo para un estudio de validación efectuado por un solo laboratorio.

9.4 Muestras de referencia

En vez de emplear muestras de referencia, los microbiólogos emplean controles de muestras analíticas positivas, como los que se describen en la sección 9.2. Estos controles no sólo garantizan que los soportes actúen adecuadamente, sino que además sirven de referencia; p.e. el analista puede comparar las reacciones de muestras desconocidas con las de la muestra de referencia.

Cuando analice muestras de "referencia" y muestras desconocidas o de ensayo, el analista deberá seguir al pie de la letra el método recomendado. Con frecuencia existe la tentación de "mejorar" o modificar un método oficial o estándar. No obstante, modificaciones que parecen secundarias pueden poner en peligro la integridad de los resultados analíticos, contradiciendo así el método oficial o estándar.

9.5 Referencias

1. Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed., K. Helrich (Ed.). Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

2. U.S. Food and Drug Administration. 1984. Bacteriological Analytical Manual, 6th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

3. American Public Health Association. 1984. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 2nd ed., M.L. Speck (Ed.). American Public Health Association, Washington, DC.

4. Health Protection Branch. 1989. Compendium of Analytical Methods for the Microbiological Analysis of, and the Detection of, Extraneous Materials in Foods. Poly Science Publications, Inc., Montreal, Canada.

5. Refai, M.K. 1981. Manuales para el Control de Calidad de los Alimentos. 4. Análisis microbiológico. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia.

6. Association of Official Analytical Chemists. 1982. Handbook for AOAC Members, 5th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

7. Committee on Interlaboratory Studies. 1988. Guidelines for collaborative study procedure to validate characteristics of a method of analysis. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71:160-172.

8. Andrews, W.H. 1987. Recommendations for preparing test samples for AOAC collaborative studies of microbiological procedures for foods. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70:931-936.

10. ENSAYOS CON ANIMALES

Diversas especies de animales (ratones, ratas, hámsters, conejillos de indias, conejos, gatos, perros, monos y pollos) se emplean en los procedimientos de laboratorio. De todos ellos el más utilizado es el ratón, por lo relativamente barato que resulta de comprar, criar y mantener. Aunque animales más grandes como los conejos pueden emplearse para producir anticuerpos o determinar reacciones tóxicas dérmicas u oculares, los ratones son útiles en las técnicas microbiológicas básicas, como la determinación de la presencia de la toxina Clostridium botulinum, o toxina de la parálisis de los mariscos. Así pues, el presente examen se centrará exclusivamente en el empleo de ratones para los ensayos de laboratorio.

10.1 Higiene personal

Los analistas deben tomar precauciones especiales de higiene personal cuando trabajen con animales. Las manos deben lavarse cuidadosamente antes de tocar los ratones, y de nuevo antes de salir de la habitación en que estén los animales. En las operaciones de alimentación, lavado, manipulación o eliminación de ratones infectados, deberán llevarse guantes de goma desechables para evitar el contacto cutáneo. Mientras esté manipulando a los ratones, y después de haberlo hecho, el analista no deberá tocarse la cara, nariz, ojos o boca. Cuando maneje jeringas, el analista no deberá llevar sandalias abiertas, que podrían causar accidentes. Estará prohibido comer, beber, fumar o guardar alimentos en la habitación de los animales. Las personas que entren en una habitación en la que haya animales infectados deberán llevar máscaras de cirujano y batas desechables que puedan sacarse antes de que el analista salga de la habitación. Estos artículos deberán meterse en un saco de plástico contra riesgos biológicos, para su tratamiento subsiguiente en autoclave.

10.2 Pedidos y cuarentena

El analista que haga un pedido de ratones deberá indicar la especie, raza, sexo, edad, peso, tipo de caja de cartón, número de animales y fecha de llegada. La llegada de los ratones deberá programarse para que ocurra durante el horario normal de trabajo.

A su llegada, los ratones deberán ser inspeccionados por un oficial médico veterinario (OMV) o su representante, y tenerse en cuarentena por lo menos durante una semana o más, según indique el OMV, en las mismas condiciones ambientales y nutricionales que prevalecerán durante el estudio. La cuarentena transcurrirá en una habitación separada de aquella en la que se encuentren los otros ratones. Los ratones resultantes de cruces en el laboratorio no tienen que someterse necesariamente a cuarentena. Una vez finalizada la cuarentena, el OMV dará traslado de los animales al investigador, con el certificado de sanidad animal (que se reproduce en el Anexo 13).

10.3 La habitación de los animales

Deben preverse habitaciones separadas para los animales, bajo presión negativa. No hay que tener en una misma habitación animales de especies distintas; así pues, la habitación destinada a los ratones no deberá contener ningún otro animal de laboratorio. En la habitación

deberá haber un lavabo con grifos de agua fría y caliente. Los suelos deberán barrerse y fregarse todos los días con una solución desinfectante, y las paredes deberán limpiarse y desinfectarse por lo menos una vez al mes. La parte superior de los bancos, las estanterías, las puertas de vidrio y la zona del lavabo deberán desinfectarse antes de cada experimento.

La temperatura y la humedad de la habitación se mantendrán bajo observación constante con un higrotermógrafo. Idealmente la temperatura debería mantenerse entre 18 y 26°, con una humedad entre el 40 y el 70 por ciento.

El higrotermógrafo indicador de la temperatura se calibrará del modo descrito para el termógrafo en la sección 6.2. El higrotermógrafo para la indicación de la humedad se calibrará colocando en su interior un saco de polietileno con un cuenco de agua. Después de 6 horas de exposición, se supone razonablemente que la humedad relativa es del 96 por ciento, nivel comprendido en la escala de sensibilidad del instrumento. De ser preciso, el estilete puede ajustarse para reflejar este nivel de humedad en la hoja de registro.

La hojas de registro de los higrotermógrafos deben cambiarse todas las semanas para que no se superpongan las impresiones. El analista que instale y extraiga las hojas deberá poner sus iniciales en los registros y fecharlos. Las hojas usadas del higrotermógrafo deberán guardarse en un libro de registro.

El analista deberá controlar la iluminación de la habitación. En la habitación deberá haber un cronorregulador eléctrico para mantener los ciclos normales día/noche, alternando períodos de 12 horas de luz y obscuridad.

10.4 Jaulas

Los ratones deberán estar en jaulas de plástico o de acero inoxidable que sean fáciles de limpiar. Las jaulas, fundas de jaulas y camas deberán cambiarse por lo menos dos veces a la semana.

Las jaulas deberán ser suficientemente grandes para evitar el hacinamiento, con una altura de 13 cm. El espacio requerido por cada ratón depende de su peso: 39 cm^2 para los ratones de hasta 10 g de peso; 52 cm^2 para los ratones de 10 a 15 g de peso; 77 cm^2 para los ratones de 15 a 25 g de peso, y 97 cm^2 para los ratones de más de 25 g de peso.

En cada jaula deberá haber una etiqueta con la siguiente información: número del proyecto y/o experimento, tipo de toxina o bacteria utilizada para la inoculación, fecha de la inoculación, dosis de inoculación y nombre del investigador. Esta información debe figurar también en el libro de registro.

10.5 Cuidados y alimentación

A los ratones debe proporcionárseles piensos comerciales nutricionalmente equilibrados. Las hembras preñadas deberán alimentarse con un pienso comercial de fórmula especial. Los piensos para todos los ratones habrán de cambiarse dos veces a la semana, y el agua tres veces a la semana. Deberá llevarse un registro de la frecuencia de sustitución de los piensos y el agua.

La salud y la apariencia general de los ratones deberán controlarse diariamente. Son síntomas de enfermedad en los ratones la pérdida de peso, la menor actividad y la caída del pelo que deja al descubierto zonas del cuerpo, especialmente en el cuello y el dorso. Los ratones que parezcan enfermos deberán aislarse hasta que desaparezcan los síntomas. Los ratones con síntomas persistentes deberán sacrificarse, someterse a tratamiento en autoclave y eliminarse, como se describe en la sección 10.8.

10.6 Selección para el ensayo

Para reducir al mínimo la posibilidad de desviaciones en la selección de los ratones destinados a los estudios de laboratorio, podrá aplicarse el siguiente procedimiento de aleatorización. Todos los ratones de un mismo envío que hayan pasado el período de cuarentena y se hayan aclimatado se pesan y se separan en cajas según el peso. Los pesos de los animales de una misma caja no deben diferenciarse en más de 1 g.

Como ejemplo de selección aleatoria, supongamos que hay 10 ratones, 5 en la caja de clase "x" de peso y los otros 5 en la caja de clase "y". Si deben ensayarse dos grupos experimentales, en cada grupo se colocará un ratón de la caja "x". A continuación se introducirá en cada grupo un ratón de la caja "y", y así sucesivamente hasta que cada grupo experimental cuente con cinco ratones. Es posible que haya que cambiar de caja a algunos ratones para que el peso medio de cada grupo no presente una desviación de más de 3-6 g.

Una vez se hayan asignado los ratones a un grupo experimental concreto, podrán etiquetarse o identificarse tiñéndoles la cola. El color rojo (azafrán 0), púrpura (cristal violeta) o verde (verde brillante) pueden obtenerse disolviendo 0,1 g de tintura en 100 ml de una mezcla de acetona y alcohol al 50:50. Estos reactivos deben identificarse y marcarse en la forma indicada en la sección 7.2. La tintura se aplica a las colas de los ratones con un algodón.

10.7 Cómo sujetar e inyectar a los ratones

Los procedimientos para sujetar e inyectar a los ratones se indican en el Anexo 14. Aunque hay varias vías de inyección (intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intravenosa y por sonda), la primera de éstas es la más utilizada en los procedimientos microbiológicos básicos.

10.8 Eliminación

Todos los ratones inyectados, incluso los que sobrevivan a las inoculaciones experimentales, deberán sacrificarse (Anexo 15), de ser necesario, y someterse al tratamiento en autoclave. Los ratones no inoculados que hayan muerto de causas al parecer naturales, o de causas no explicadas, deberán tratarse también en el autoclave. Además de los ratones, deberán tratarse en autoclave las camas y las jaulas. Se recomienda que todos los materiales se traten en autoclave durante 30 minutos por lo menos, y preferiblemente 45, a 121°. Los cuerpos de los animales tratados en autoclave deberán incinerarse.

11. DOCUMENTACION

Debe procederse a un registro sistemático y documentado de toda la información que tenga alguna relevancia práctica para los análisis realizados. La documentación puede hacer falta para reconstruir una situación analítica mucho después de que se haya efectuado el análisis. Por ejemplo, en el caso de una muestra reglamentaria, es posible que transcurra bastante tiempo entre el momento en que se comunican las conclusiones del análisis y aquél en el que dichas conclusiones se examinan en los tribunales.

Los registros han de permitir que, si se presenta la necesidad de hacer un nuevo análisis, éste pueda llevarse a cabo en las mismas condiciones y de la misma manera que el anterior. Todas las observaciones y cálculos deben registrarse de modo claro y permanente, preferiblemente a pluma, en el momento que se realicen. Si se cometen errores en el registro de los datos o en los cálculos o interpretaciones, los datos erróneos deberán tacharse de modo que sigan siendo legibles, insertando inmediatamente el dato correcto encima del otro.

Los registros deben retenerse durante un plazo mínimo, a menudo previsto en las leyes del país, y han de protegerse contra el uso indebido, la pérdida o los daños. En el caso de los registros informatizados, esta norma se aplica también a los códigos de seguridad.

11.1 Localización

La documentación es un mecanismo que permite localizar una muestra de laboratorio desde que se recoge hasta que se elimina. En el Anexo 16 figura un organigrama que indica la relación entre las diversas fases o elementos de la documentación.

En la mayoría de los casos la muestra es recogida por un inspector o investigador, y no por el analista del laboratorio. La muestra se precinta y se envía al laboratorio para su análisis. Junto a las muestras recogidas se remiten los registros de la recolección de las muestras. Cuando la muestra llega al laboratorio, el custodio prepara el registro de responsabilidad de la muestra, que documenta la identidad e indica la ubicación de la muestra en el almacén, la fecha de llegada y el nombre de la persona responsable del almacenamiento. El supervisor del laboratorio encarga a uno o varios analistas que examinen la muestra. El registro de responsabilidad de la muestra contiene también las fechas y firmas de las personas (custodio de las muestras y analistas) que asumen sucesivamente la responsabilidad de la muestra.

Todos los resultados analíticos del examen de la muestra se anotan en la ficha de trabajo del analista, y se prepara un informe de laboratorio que contiene una versión resumida de los resultados analíticos que figuran en la ficha. Este informe, y la correspondiente ficha del analista, se archivan para que los datos puedan utilizarse ulteriormente. En el registro deben figurar las fechas y firmas de las personas que hayan sacado un registro de su sitio, o lo hayan vuelto a poner.

Después de efectuado el análisis de laboratorio, es posible que la muestra deba almacenarse durante un largo período, mientras se desarrollan los trámites judiciales. El lugar y las condiciones de almacenamiento, los nombres de los responsables del almacenamiento, las fechas y las firmas de las personas (custodio de la muestra y analistas) que hayan dispuesto de la muestra durante este período, se anotarán en el registro de responsabilidad de la muestra.

La secuencia de registros (informe de recolección de la muestra, precinto oficial de la muestra, registro de responsabilidad de la muestra y ficha de trabajo del analista) deben constituir un cuerpo continuo de documentación que proporcione un historial claro, exacto e indiscutible de la muestra, sin que haya discrepancias entre los diversos elementos de la documentación. Ello debería permitir seleccionar una muestra en cualquier punto de su recorrido por el laboratorio, encontrar todos los documentos relacionados con ella y reconstruir su historial desde el momento en que llegó al laboratorio, junto con la información que la acompañase.

11.2 Registros de recolección de muestras

El registro o informe de recolección de muestras suele correr a cargo del inspector o investigador. No obstante, el analista debe velar por que la información proporcionada en el informe refleje con exactitud la identidad de la muestra sometida al análisis de laboratorio, y que la información de la ficha del analista (sección 11.3) sea coherente con la que figura en el informe de recolección.

En el Anexo 17 puede verse un modelo de informe de recolección de muestras. Este es el formulario utilizado por la Food and Drug Administration de los EE.UU. para satisfacer sus necesidades específicas. Como algunos de los conceptos no son aplicables a otros organismos u organizaciones, sólo consideraremos aquí los de interés o aplicabilidad general o común.

a) Casilla 1: Introducción. Cualesquier instrucciones especiales relativas a la condición del lote o el manejo de la muestra.

b) Casilla 2: Tipo de la muestra. Pueden determinarse varios tipos distintos de muestras. Las muestras oficiales son aquellas que, si infringen las normas, sirven de base para acciones legales concretas. Las muestras de investigación se recogen para documentar observaciones o corroborar conclusiones reglamentarias o de otra índole, y comprenden las muestras de fábrica (materias primas y productos acabados para demostrar las condiciones de fabricación), muestras de encuesta (para proporcionar información acerca de las prácticas de la industria respecto de una cuestión determinada), y muestras para reclamaciones (muestras para la investigación de casos de daños o intoxicaciones). Las muestras relativas a las normas alimentarias suministran información de base para las normas microbiológicas de los alimentos.

c) Casilla 3: Número de la muestra. Cada muestra se identifica con un número único e irrepetible.

d) Casilla 7: Fecha de recolección. Debe indicarse la fecha de recolección de la muestra. Si hizo falta más de un día para recoger la muestra, se indicarán los días primero y último (p.e. 1-3 de abril de 1989).

e) Casilla 12: Muestras conexas. Se indican los números de las otras muestras de la misma remesa o de otras muestras que puedan estar relacionadas con éstas.

f) Casilla 17: Nombre e identificación del producto. Debe indicarse la denominación específica del producto.

A efectos de identificación se indica el tipo de recipiente (a granel, en saco de papel, en envases desechables, en caja de plástico, etc.) así como las partes correspondientes de la etiqueta (nombre de la marca, denominación genérica, contenido en cantidad, nombre y dirección del fabricante o distribuidor, código).

Cuando el producto está embalado en una caja de cartón, un contenedor de transporte o cualquier otro recipiente semejante, deberá registrarse el etiquetado del recipiente.

Cuando se reproduzca el contenido de una etiqueta, la ortografía deberá ser la misma que la de los términos de la etiqueta, con las mismas mayúsculas, puntuación y disposición de las palabras.

g) Casilla 18: Motivo de la recogida de la muestra. Debe indicarse detalladamente el motivo de que se haya recogido la muestra, así como la infracción presunta o el análisis deseado. Los memorandos, cartas u otros documentos de instrucciones entre distritos o regiones, o procedentes de la sede, deberán referenciarse en detalle suficiente para facilitar la localización de cualquier documento.

h) Casilla 19: Códigos de fabricación. Se indicarán todos los códigos, números de los lotes y códigos de control de series que figuren en las etiquetas, cajas de cartón y contenedores de transporte.

i) Casilla 20: Fabricante. Se indica el nombre y dirección (calle, ciudad, país y código postal) del fabricante.

j) Casilla 21: Transportista. Se indica el nombre y dirección (calle, ciudad, país y código postal) del transportista.

k) Casilla 22: Intermediario. En esta casilla se indica el nombre y la dirección (calle, ciudad, país y código postal), y el número de teléfono completo del intermediario que proporcionó la muestra.

l) Casilla 23: Tamaño del lote de procedencia de la muestra. Se indica la cantidad de productos disponibles antes de extraer la muestra, con arreglo al inventario del lote efectuado por el recolector. Se anota asimismo el número de cajas de transporte y el tamaño de los componentes, p.e. 250 sacos/50 kg.

m) Casilla 27: Descripción de la muestra y método de recolección. Se describe la muestra y se indica el número y tamaño de las unidades o subunidades muestreadas, para que se sepa cómo se tomó cada una de ellas. Por ejemplo, "tres latas de cada caja, de un lote de 20 cajas cerradas, elegidas al azar".

n) Casilla 28: Modo de preparación. Se explica cómo se preparó la muestra antes de someterla al laboratorio, cómo se identificaron las unidades o subunidades muestrales y cómo se envolvió y precintó la muestra. Se indica también la forma en que se entregó la muestra al laboratorio (p.e. sacos de papel, caja de cartón original).

o) Casilla 27: Identificación del recolector en el paquete y/o la etiqueta. El recolector de la muestra cita la identificación que figura en los embalajes o etiquetas, p.e. "79-180-121 10-15-78 SHR".

p) Casilla 308: Identificación del recolector en el precinto. El recolector de la muestra cita la identificación empleada en el precinto oficial final de la muestra, p.e. "79-180-121 10-15-78, Josefa Fernández".

q) Casilla 31: Muestra entregada a... Se indica el nombre de la persona a la que se entregó la muestra. Si la muestra se entregó al custodio de las muestras bajo precinto, se deberá indicar "entregado en persona al custodio de las muestras Juan López". Si la muestra se entregó a un analista, se indicará "entregado en persona al analista Francisco Gutiérrez". Si la muestra ha sido transportada, deberá indicarse el nombre del transportista al que se entregó la muestra y el número del conocimiento de embarque, en su caso.

r) Casilla 32: Fecha de entrega. Se indica la fecha en que la muestra se entregó al laboratorio o transportista.

s) Casilla 33: Laboratorio. Se indica el nombre del laboratorio al que se envió la muestra.

t) Casilla 35: Informe y registros originales de recolección de la muestra. Se indica el nombre del laboratorio al que se hayan enviado el informe y los registros originales de recolección de la muestra.

u) Casilla 36: Registros obtenidos. Se facilita una lista de todos los documentos y registros obtenidos por el inspector o investigador, por tipo de documento o registro, número y fecha. Por ejemplo, número y fecha de la factura, registros de transporte, certificados oficiales, etc.

v) Casilla 37: Observaciones. Si este espacio se utiliza para ampliar las informaciones de otras casillas, habrá que indicar el número o números de las casillas de referencia.

w) Casilla 41: Recolector. El recolector deberá anotar su nombre a máquina o a mano (en mayúsculas) y firmar el informe de recolección. Sólo firmará el informe la persona que haya identificado y precintado la muestra, cuyas iniciales estén en las subunidades y cuyo nombre figure en el precinto.

11.3 Fichas de trabajo e informes de los analistas

Las fichas de trabajo de los analistas proporcionan una relación escrita de los resultados analíticos del laboratorio. Aunque existen diversos modelos de fichas de trabajo para los analistas, todas ellas deben reunir los siguientes requisitos:

a) Toda la información básica debe registrarse directamente en la ficha antes de dar comienzo al análisis. En cuanto disponga de la ficha el analista deberá poner en ella sus iniciales. Desde un principio deberá llenarse el mayor número posible de espacios de la ficha.

b) Todas las anotaciones deberán ser bien legibles y estar escritas con tinta permanente.

c) Ninguna anotación deberá borrarse, ni habrá que escribir encima de ella. Si se hace una anotación incorrecta, el analista deberá tacharla, escribir encima de ella la cifra o indicación correcta, y poner sus iniciales al lado de la corrección.

d) No deberá descartarse ningún dato sin explicación. Si es necesario descartar datos, el analista deberá tachar la anotación, poner sus iniciales, indicar la fecha y explicar por qué se ha descartado el dato.

e) El método analítico exacto que se emplee debe referenciarse claramente y de modo completo. Si el método no se ha publicado, deberá darse una descripción completa en la ficha de trabajo o en una hoja complementaria. Muchos métodos no facilitan detalles sobre la preparación de la muestra. Si el método no da instrucciones específicas sobre la preparación, el analista deberá facilitar una descripción completa de la manera de preparar la muestra.

f) Si el análisis se ha hecho por duplicado, triplicado, etc., deberá anotarse el resultado de cada análisis, así como un resumen de los resultados.

g) Habrá que emplear un número adecuado de cifras significativas. Un número de cifras mayor al que justifican las limitaciones del método da una falsa impresión de la exactitud de éste.

h) Si en el análisis participa más de un analista, en la ficha de trabajo deberá constar claramente cuál analista rompió el precinto, y quiénes llevaron a cabo cada fase del análisis.

i) Las hojas complementarias que acompañen a la ficha de trabajo del analista deberán llevar una numeración consecutiva, p.e. 1 de 8, 2 de 8, ... 8 de 8 páginas.

En el Anexo 18 se ofrece un ejemplo de ficha de trabajo de un analista. En esta ficha la información se proporciona como sigue:

a) Casilla 1: Producto. El analista debe seguir en lo posible la terminología del informe de recolección (Anexo 17, punto 17) al rellenar este espacio. Siempre que se pueda se empleará el nombre común del producto (p.e. helado de vainilla, chocolate de leche o patas de rana congeladas). Si no existe una denominación común del producto, deberá usarse un término descriptivo como "polvo marrón en un saco de plástico".

b) Casilla 2: Número de la muestra. El analista deberá anotar cuidadosamente el número de la muestra que figura en el informe de recolección (Anexo 17, punto 2).

c) Casilla 3: Precintos de la muestra. Si la muestra va precintada, deberá comprobarse la caja correspondiente para ver si el precinto está roto o intacto. Si la muestra no va precintada, deberá señalarse este extremo.

d) Casilla 4: Fecha de recepción. Se anotará la fecha en que el analista haya recibido la muestra para análisis.

e) Casilla 5: Recibida de... Debe anotarse el nombre completo de la persona que haya entregado la muestra al analista. Si el analista ha obtenido la muestra en el almacén, se indicará la procedencia (p.e., congelador).

f) Casilla 6: Distrito o laboratorio. Debe indicarse el nombre del laboratorio que lleva a cabo el análisis.

g) Casilla 7: Descripción de la muestra. Debe facilitarse una descripción completa de la muestra, que coincida en la medida de lo posible con el informe de la recolección (Anexo 17, punto 27). Se indicará el número y tipos de embalajes (cajas de cartón, bolsa de papel, etc.), así como el número y tipo de cada uno de los recipientes en el embalaje. Si el recipiente no va acompañado de una declaración del contenido neto, se dará una descripción del tamaño y el tipo (p.e. "bolsa de papel que contiene 5 libras del producto").

La inscripción del precinto y la identificación del inspector deben consignarse literalmente, con indicación del emplazamiento de los sellos, indentificación y números de subunidades.

Si procede, deberá hacerse una declaración en el sentido de que la muestra estaba completamente congelada a la recepción, o que se ha descongelado, o que, al parecer, se ha descongelado y vuelto a congelar, según el caso. Hay que dejar constancia de cualquier olor poco habitual. Si alguna parte de la muestra está dañada, deberá especificarse el estado de la muestra y los números de las subunidades dañadas.

h) Casilla 8: Contenido neto. Esta sección sirve para proporcionar información sobre la declaración del contenido neto en la etiqueta del producto, y para registrar los resultados de una inspección de rutina del contenido neto. Se marcará el recuadro que corresponda.

i) Casilla 9: Etiquetado. Anotar en los espacios en blanco que preceden a las indicaciones "ORIGINALES PRESENTADOS" y "COPIAS PRESENTADAS", el número de etiquetas de cada tipo presentadas por el analista y/o el inspector con sus registros. Cuando el inspector haya presentado la etiqueta, anótese en el punto 10, Etiquetado, que la etiqueta fue presentada junto con el informe de la recolección. Indíquese "NINGUNA" en el espacio correspondiente, cuando no se haya presentado ninguna etiqueta junto con la muestra o el informe de recolección.

j) Casilla 10: Resumen del análisis. Deberá registrarse la siguiente información:

RECIPIENTE: Debe describirse el tamaño, tipo, color y cierres del recipiente comercial inmediato que contiene el producto y de los recipientes de venta al por menor. Se indicará cualquier anormalidad o condición insólita del recipiente (p.e. lata abierta, derrames, precinto comercial roto), y se describirán los recipientes utilizados por el inspector o el investigador.

ETIQUETADO: Esta información indica cómo y dónde está etiquetado el recipiente (envoltorio de papel impreso, pegatina frontal, etc.). El analista describe todas las etiquetas relacionadas con la muestra, incluidas las de las cajas de transporte, inserciones y envoltorios de las unidades de muestreo. Todas las etiquetas originales presentadas por el analista deberán incluir el número de la muestra, la fecha y las iniciales en la propia etiqueta y en el papel al que vaya pegada.

CODIGO: Se anotan los códigos, con indicación de tipo y emplazamiento. Si la muestra sometida no lleva un código, pero el informe de recolección indica uno, se anotará este último (Anexo 17, punto 19).

PRODUCTO: Se proporcionará una descripción completa y exacta del producto, incluidos el color, el olor y la apariencia general, si procede. En ningún caso deberá catarse una muestra destinada a análisis microbiológico. Deberán emplearse los nombres comunes de los productos fácilmente reconocibles (p.e. patas de rana congeladas, guisantes en lata u hongos frescos) e indicarse cualquier anormalidad (p.e. olor pútrido, decoloración o dilatación de las latas).

ANALISIS: Los resultados de los análisis microbiológicos deben resumirse y el analista ha de dar una referencia del método empleado, o detalles del mismo si no se ha publicado. Deberá proporcionarse una descripción exacta del modo en que se seleccionó la muestra analítica a partir de la muestra total, y de cualquier preparación efectuada antes de que la parte se sometiera a análisis (p.e. mezcla, composición, molturación). Se indicarán los tipos de controles empleados y los resultados de esos controles.

k) Casilla 11: Muestra de reserva. Deberá hacerse una descripción clara de la muestra de reserva, indicando el precinto que haya aplicado el analista. Deberá especificarse el número de subunidades y la cantidad de cada una de ellas. Si la muestra de reserva no se devuelve al custodio, el analista deberá indicar cómo y dónde está almacenada la reserva.

l) Casilla 12: Firmas de los analistas. El analista firma con su nombre completo. Cuando intervenga más de un analista, el analista que rompió el precinto firmará en el espacio 12a, marcando el recuadro "PRECINTO ROTO".

m) Casilla 13: Verificación de la ficha de trabajo: La exactitud, detalle y compatibilidad de la ficha de trabajo, deberán cotejarse con otros documentos. La verificación correrá a cargo del supervisor o su representante. La persona que comprueba la ficha de trabajo es la misma que firma y fecha esta sección. Si se detecta un error, el supervisor no lo corregirá sino que lo pondrá en conocimiento del analista, quien procederá a su corrección.

n) Casilla 14: Fecha de presentación. Se indica la fecha en que el analista presentó al supervisor la ficha de trabajo.

El total de páginas, los números de cada página y el número de apéndices se indicarán al pie de la ficha.

El reverso de la ficha de trabajo se rellenará del modo siguiente:

a) El número de la muestra se indica en el ángulo superior derecho antes de que se efectúe ninguna anotación. Esto da la seguridad al analista de que anota los datos en la ficha adecuada (sin tener que consultar el anverso), cuando se analice más de una muestra a la vez.

b) Se referencia el método exacto empleado. Toda modificación en el método de referencia deberá indicarse, dando los motivos.

c) Deberán mostrarse claramente todos los cálculos, con el número de cifras significativas utilizadas.

d) Respecto de todos los pesajes se indicarán el peso bruto, la tara y el peso neto.

e) Se explicará el procedimiento con que se realizaron las diluciones.

f) Se indicará el empleo de controles y sus resultados.

g) Los datos y los cálculos de cualquier anexo o apéndice se expondrán en forma resumida en el reverso de la ficha.

Pueden usarse diversos tipos de hojas complementarias para análisis microbiológicos específicos. A continuación damos algunos ejemplos:

a) Resumen de resultados bacteriológicos (Anexo 19)
b) Registro bacteriológico (Anexo 20)
c) Registro de Salmonella (Anexo 21)
d) Registro de Shigella (Anexo 22)
e) Hoja complementaria para la carne enlatada (Anexo 23)
f) Hoja complementaria para el botulismo (Anexo 24)
g) Registro bacteriológico de mariscos (Anexo 25).

Son tan variadas las hojas complementarias que no resultaría práctico examinar cada una de ellas, pero las adjuntamos para que el lector se haga una idea del registro de información microbiológica específica. En el reverso de las hojas complementarias correspondientes, el analista deberá indicar todos los medios, compuestos químicos y sueros utilizados, así como su procedencia (fabricante) y número de lote.

11.4 Otros documentos

En cuadernos de notas de tapas duras, con páginas prenumeradas, se registrarán los datos y observaciones analíticas distintos de los obtenidos durante el análisis de una muestra oficial; los datos de este último análisis deberán anotarse en la ficha de trabajo del analista, y no en el cuaderno de notas.

Como se ha indicado anteriormente, todos los datos de la garantía de calidad deben apuntarse en cuadernos de notas. Estos datos pueden ser, por ejemplo, la calibración de los pesos y el equipo, el mantenimiento y reparación del equipo, la preparación de medios y soluciones reactivas, la vigilancia de la calidad microbiológica del aire del laboratorio y la vigilancia de la temperatura de la incubadora. Conviene reservar las primeras páginas del cuaderno de notas al índice.

Además de contener datos sobre la garantía de la calidad, los cuadernos de notas pueden servir para anotar datos de las investigaciones. Las directrices generales para el registro de datos en las fichas de trabajo de los analistas son válidas también para el registro de datos de investigación en los cuadernos de notas.

Las pruebas de la capacidad de los analistas se examinaron en la sección 4.3. Cada análisis de una muestra verificada deberá registrarse, y los resultados habrán de archivarse. Conviene alentar a los analistas a que compulsen periódicamente los archivos para evaluar su rendimiento. Los supervisores deberán revisar periódicamente los archivos para determinar si conviene intensificar la frecuencia de los análisis de ensayo de las muestras, o si hace falta una capacitación adicional.

12. INSPECCIONES Y COMPROBACIONES DE LA GARANTIA DE CALIDAD

Las inspecciones y las comprobaciones de la garantía de calidad permiten a la administración evaluar la eficacia del programa de garantía de la calidad. Sobre la base de los resultados de esas inspecciones y comprobaciones, la administración decide cuestiones tales como las necesidades futuras de capacitación, la reasignación de personal, los ajustes presupuestarios, la necesidad de medidas correctivas y las notas personales favorables. Con el tiempo, esas inspecciones y comprobaciones deberían mostrar un aumento regular del nivel de observacia del programa de garantía de la calidad, de la capacidad de los analistas y de la calidad de los datos, y ello aunque haya una intensa rotación de personal en el sistema, a condición de que el programa de garantía de calidad sea válido y esté bien administrado.

12.1 Comprobación de los trabajos en curso

El supervisor deberá comprobar el trabajo del analista con frecuencia, e incluso todos los días. Podrá utilizar para ello la ficha de trabajo, que es un importante producto final del laboratorio de análisis, con objeto de verificar la calidad del trabajo de laboratorio. En cada ficha de trabajo deberá dejarse un espacio para la firma del supervisor, que corrobora que se ha verificado la exactitud y el detalle de la ficha de trabajo. Antes de firmar la ficha, el supervisor deberá cerciorarse de que:

a) La ficha describe de modo claro y completo la muestra del laboratorio, y su estado cuando la recibió el analista.

b) La información de la ficha es comparable a la del informe de recolección de la muestra. Tanto este informe como la ficha de trabajo pueden utilizarse para documentar la continuidad e integridad de la muestra.

c) La ficha describe en detalle la utilización de los cultivos de control de referencia adecuados, otros controles, medios, números de lotes de medios y reactivos.

d) Los cálculos matemáticos son exactos y fáciles de entender.

e) Si más de un analista ha participado en el análisis, cada analista ha puesto sus iniciales en la parte de la cual es responsable.

f) En la ficha de trabajo se indica el emplazamiento de las muestras de reserva o el destino final de la muestra de laboratorio.

Además de comprobar la ficha de trabajo del analista, el supervisor podrá pedir una explicación oral de su contenido. En esta explicación, el analista deberá dar cuenta de todas las fases del análisis, basándose en la ficha de trabajo. Esencialmente, lo que se pide al analista es que reconstruya verbalmente todo el procedimiento analítico, y explique los resultados.

Además de la ficha de trabajo, el supervisor deberá comprobar frecuentemente diversos elementos del control de calidad tales como el mantenimiento y calibración del equipo, las condiciones de almacenameinto de los cultivos madre de referencia, la preparación de los medios, el cuidado y la alimentación de los animales, etc. Asimismo deberá determinar si esos y otros aspectos del control de calidad están adecuadamente documentados, según las disposiciones del programa aprobado de garantía de la calidad.

12.2 Comprobaciones retrospectivas

Aparte de las comprobaciones diarias mencionadas, el funcionamiento del laboratorio debe controlarse mediante una comprobación retrospectiva más detallada. Esta comprobación correrá a cargo de la unidad de garantía de la calidad, y su periodicidad la decidirá la administración. Algunos laboratorios se comprueban cada tres meses, mientras que en otros la comprobación es anual.

Como se indicaba en la sección 1.4, es la administración quien determina la naturaleza y el tamaño de la unidad de garantía de la calidad. En los grandes laboratorios, la unidad de garantía de la calidad puede componerse de dos o más personas dedicadas exclusivamente a controlar el programa de garantía de la calidad. En los laboratorios más pequeños, uno o varios microbiólogos pueden encargarse de controlar el programa de garantía de la calidad, entre otras actividades. En esta última hipótesis, el encargado habrá de ser lo más objetivo posible y no deberá comprobar su propio trabajo ni el que esté sujeto a su supervisión directa. En todo caso, los inspectores deberán tener conocimiento y experiencia suficientes para entender la naturaleza de la labor científica que están inspeccionando.

Las inspecciones a cargo de la unidad de garantía de la calidad suelen anunciarse anticipadamente. La fecha exacta de inspección se comunica a la administración y a los supervisores directos, para dar tiempo suficiente al servicio a que se prepare, y reducir al mínimo las perturbaciones del funcionamiento normal del laboratorio. No obstante, en determinadas circunstancias podría ser conveniente llevar a cabo una inspección por sorpresa. Ello permitiría al inspector observar cómo funciona cotidianamente el laboratorio, sin la ventaja que supone para los analistas el poderse preparar antes. No obstante, de esta clase de inspecciones deberán hacerse las menos posibles.

La naturaleza y duración de la inspección pueden variar considerablemente. Algunas visitas apenas durarán un cuarto de hora, mientras que otras podrían durar toda una jornada. En el Anexo 26 figura un formulario de inspección, para el analista y para el inspector. El primero podrá emplear este formulario para preparar el examen, mientras que el segundo lo utilizará para la inspección. si se quiere que la inspección sea breve pero significativa, una posibilidad sería rellenar una o dos secciones del formulario en cada inspección. Por ejemplo, una inspección podría referirse solamente al mantenimiento del equipo, mientras que en una visita subsiguiente podría inspeccionarse la documentación. Si la administración decide dedicarle los recursos necesarios, la inspección podrá ser amplia y prolongada, y abarcar todos los puntos del formulario.

Para no suscitar temores y facilitar respuestas más receptivas, un miembro del personal debería acompañar a los examinadores del control de calidad durante la inspección. Los inspectores deberán preguntar todo lo que no esté claro, dando al personal oportunidad suficiente para aclarar cualquier equívoco.

Después de la visita de inspección, los miembros de la unidad de garantía de la calidad deberán reunirse con el director del laboratorio y con el miembro del personal que les acompañó durante la inspección. Los inspectores discutirán sus conclusiones y formularán recomendaciones para la mejora de sectores problemáticos específicos.

Por último, la unidad de garantía de la calidad deberá preparar un informe escrito. Es importante que el informe se prepare a tiempo, de ordinario durante la semana siguiente a la inspección. antes de someter el informe a la administración, el director del laboratorio y su personal deberán tener oportunidad de examinarlo, para que puedan corregirse los eventuales errores o malentendidos. El informe deberá redactarse en un lenguaje objetivo, impersonal y sin alusiones inconvenientes.

Las deficiencias, en caso de haberlas, deberán identificarse indicando el número de la habitación en la que se hayan observado. Si se trata de deficiencias repetidas o que no se han corregido desde la pasada inspección, habrá que indicarlo en consecuencia. Las diversas deficiencias deberán enumerarse en orden de gravedad. El informe deberá contener recomendaciones específicas para corregir las deficiencias, sobre todo las importantes, con espíritu constructivo.

12.3 Acreditación

Existen en el mundo muchos planes de acreditación aplicados por dependencias oficiales, órganos profesionales u otras organizaciones, de alcance nacional o internacional. Un plan, obligatorio o voluntario, puede aplicarse a un país, una región, una industria o un sector técnico en particular. Los laboratorios participantes deberán haber alcanzado ciertos niveles de calidad, y el organismo acreditador comprobará dichos niveles. Las comprobaciones correrán a cargo de evaluadores profesionales, que de ordinario serán expertos de la misma disciplina que el laboratorio y habrán seguido un curso sobre evaluación de laboratorios.

Hay dos elementos críticos para la acreditación o certificación de un laboratorio: el rendimiento del analista en un programa de comprobación de la capacidad, y la visita al lugar del oficial certificador.

El programa de comprobación de la capacidad se organiza por lo menos una vez al año, y todos los analistas deben participar en él. La organización certificadora envía muestras "divididas" a todos los participantes, que deben realizar ciertos análisis, p.e. un recuento de placa aeróbica o un MPN (número más probable) del total de coliformes. Todos los análisis se realizan bajo controles estrictos: todos los analistas comienzan el análisis al mismo tiempo, se utiliza un solo método uniforme, los medios se preparan de conformidad con instrucciones precisas, las placas y los tubos se cuentan o interpretan de modo semejante, etc. Terminados los análisis, los analistas participantes envían enseguida sus resultados al laboratorio u

organización certificadora. Los resultados se analizan estadísticamente y se ponen en conocimiento de los participantes.

El segundo elemento crítico para recibir la acreditación son los resultados de la visita del oficial certificador. El formato, planteamiento y estilo de esta visita son similares a los de la inspección o comprobación de la garantía de la calidad. La observancia de un buen programa de garantía de la calidad forma parte integrante de la visita de acreditación. Los oficiales certificadores se sirven de una lista para determinar la observancia de elementos tan fundamentales del programa de garantía de la calidad como son el diseño del laboratorio, la capacitación y las cualificaciones del personal, la responsabilidad e integridad de la muestra, el mantenimiento y calibración del equipo, la preparación de los medios, el empleo de métodos apropiados y, lo que es más importante, la documentación.

La Organización Internacional de Normalización (1) y el Departamento de Comercio e Industria del Reino Unido (2) han establecido directrices para la verificación de la competencia analítica de los laboratorios de ensayos. Esta última organización ha preparado un manual de garantía de la calidad que describe claramente los elementos del programa y su aplicación en un laboratorio de ensayos.

Los programas de acreditación de laboratorios ofrecen varias ventajas. En primer lugar, promueven la fiabilidad de los resultados analíticos. En segundo lugar, permiten hacer economías, por cuanto los resultados de un laboratorio pueden ser aceptados por otro sin el tiempo y el gasto que supone hacer nuevos ensayos. En tercer lugar, la acreditación aumenta la credibilidad, el reconocimiento y la categoría de los laboratorios aprobados. En cuarto lugar, con ello se proporciona retroinformación sobre la idoneidad de los métodos de ensayo para los grupos que preparan normas. Esto, a su vez, podría dar lugar a la mejora definitiva de los métodos de análisis.

12.4 Actividades de seguimiento

Después de la inspección a cargo de la unidad de garantía de la calidad, otra inspección de seguimiento debería determinar si se corrigieron las deficiencias, y cómo. Esta segunda inspección permite a los miembros de la unidad de garantía de la calidad determinar la medida en que se siguieron sus recomendaciones. Por definición, la inspección de seguimiento debería ser breve, en general no más de unos pocos minutos.

Idealmente no deberían transcurrir más de 2-4 semanas entre la inspección inicial de la garantía de calidad y la inspección de seguimiento. Hay que comprender, no obstante, que algunas condiciones ajenas a la voluntad del analista, como la reparación de una avería en el sistema de ventilación o la presencia de insectos, pueden necesitar más tiempo para corregirse.

12.5 Referencias

1. International Organization for Standardization. 1982. General requirements for the technical competence of testing laboratories, ISO/IEC Guide 25-1982(E). Organización Internacional de Normalización, Suiza.

2. Anónimo. 1984. Report of Task Force "D" at the International Laboratory Accreditation Conference, London, U.K. Department of Trade and Industry, Londres, Reino Unido.

ANEXO 1

Modelo de Manual de Garantía de la Calidad

**MANUAL DE GARANTIA DE LA CALIDAD
PARA UN
LABORATORIO NACIONAL O REGIONAL DE
OBSERVANCIA DE NORMAS ALIMENTARIAS**

El presente Manual se publica bajo la responsabilidad del
Director del Laboratorio

.....
(firmado)

No. DE EDICION (O No. DE PUBLICACION):
FECHA DE LA PUBLICACION:
No. DEL EJEMPLAR:
DISTRIBUIDO A:

INDICE

Indica el contenido del Manual, por secciones y párrafos.

DECLARACION DE LA POLITICA DE CALIDAD

La declaración normativa ha de tener un sentido propio y no limitarse a una exposición de lugares comunes, pero no es necesario que incluya declaraciones específicas. Ha de expresarse en un lenguaje directo e indicar la persona responsable de la aplicación de la política.

MUESTREO DE COMPROBACION

Conviene que el laboratorio participe en programas externos de muestreo de comprobación. En el Manual de GC deberán figurar los detalles de esta actividad. Cuando no se hayan organizado programas de muestreo de comprobación, o éstos sean demasiado costosos, y existan varios laboratorios no demasiado alejados entre sí, podrá efectuarse un programa de muestreo de comprobación en grupo.

RESPONSABILIDAD DEL MANUAL

La persona o personas responsables de la compilación, distribución, modificación o mantenimiento del Manual de Garantía de Calidad deberán indicarse en este apartado. (Con frecuencia esta persona lleva el título de Oficial de Garantía de la Calidad.)

PROCEDIMIENTO DE MODIFICACION

Deberá preverse un sistema para registrar y mantenerse al día de las modificiones que se introduzcan periódicamente en el Manual. Esto garantizará a los poseedores del Manual que disponen de un documento actualizado. El sistema puede formalizarse con un documento de actualización, como el del Gráfico 1. El propio Oficial de GC podrá incluir las modificaciones en el Manual y sacar las hojas que ya no sean válidas, o bien podrá enviar las modificaciones a los poseedores del Manual para que ellos mismos se encarguen de incorporarlas. Las hojas que ya no sean válidas deberán destruirse, guardando una para referencia. Parte del proceso de inspección consistirá en verificar que los ejemplares del Manual estén completos y actualizados.

ORGANIZACION DEL LABORATORIO

Deberá prepararse una descripción de la organización del laboratorio, tanto interna como en un contexto más amplio. Podrán incluirse organigramas (véase el Gráfico 2). En la descripción deberán indicarse las responsabilidades, y cualquier delegación de las mismas.

UNIDAD DE GARANTIA DE LA CALIDAD - MANDATO

Se definirá el mandato y las responsabilidades de la unidad de GC en relación con la garantía de la calidad. Se definirá también el mandato del Oficial de GC, en su caso.

Gráfico 1

MANUAL DE GARANTIA DE LA CALIDAD
PARA EL LABORATORIO DE OBSERVANCIA
DE LAS NORMAS ALIMENTARIAS

HOJA DE REGISTRO DE MODIFICACIONES
HOJA: a de b
DISTRIBUIDA POR: Nombre del responsable
FECHA DE DISTRIBUCION:

HOJA DE REGISTRO DE MODIFICACIONES

No. DE HOJA: c de d

El Oficial de Garantía de la Calidad anotará en el siguiente cuadro todas las modificaciones del Manual de Garantía de la Calidad

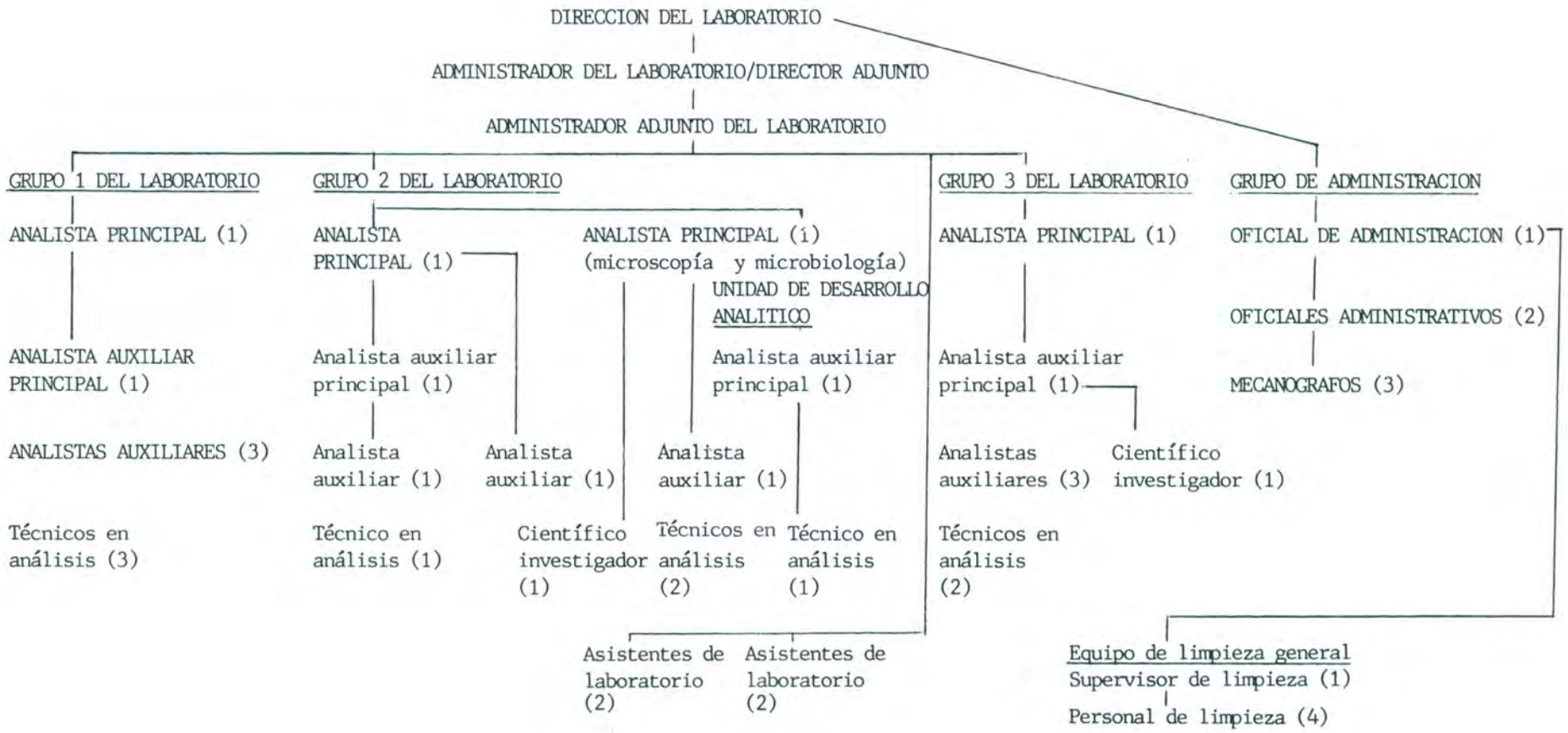
Modificación		Extraer		Insertar		Firma del Oficial de GC
Número	Fecha	Sección	Hoja	Sección	Hoja	

Gráfico 2

Modelo de Organigrama

Laboratorio de control de alimentos

ESTRUCTURA DE LA PLANTILLA DE PERSONAL



El Manual debe describir los objetivos de la capacitación, y el modo de alcanzarlos. Deben preverse actividades de capacitación en garantía de calidad, por lo menos para el personal de un cierto nivel. Una ficha de registro de capacitación, como la del Gráfico 3, es conveniente y puede mencionarse en el Manual, con un ejemplar en anexo a título de referencia. En el Manual deberá indicarse el modo de llevar el registro de capacitación y la política general en materia de capacitación.

(Obsérvese que la capacitación se examina ulteriormente en el Capítulo 4)

Gráfico 3

LABORATORIO DE ALIMENTOS
REGISTRO DE CAPACITACION

NOMBRE DEL ANALISTA:

Código del Método	Método alimentario	Teoría Fecha de terminación	Práctica Fecha de terminación Explicación/ Práctica Demostración	A la terminación Firma Firma Alumno Instructor	Aprobado para el trabajo Administrador del lab. Firma/fecha
	1. Humedad (secado en horno)				
	2. Humedad (Dean & Stark)				
	3. Ceniza				
	4. Grasa				
	5. Proteínas				
	6. Valores energéticos				
	7. Fibras (Método Van Soest)				
	8. Azúcares				
	9. Almidón				
	10. Sodio				
	11. Acidos grasos				

PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS ESTANDAR

Todos los trabajos que se realicen en el laboratorio constituyen sus operaciones y pueden describirse y documentarse en los Procedimientos Operativos Estándar (POE). Los procedimientos administrativos deberán establecerse en forma de POE. En esta sección, el Manual puede remitirse a un archivo principal independiente de POE o a una lista de POE en apéndice. Esta última podría no ser satisfactoria si los procedimientos se modifican frecuentemente, o si se introducen nuevos procedimientos.

Deberían preverse POE para trámites administrativos tales como:

Mantenimiento y recuperación de registros
Responsabilidad de las muestras
Asignación y comprobación de análisis
Comunicación de resultados

Estos POE, y los procedimientos que describen, no forman parte directa del programa de garantía de la calidad, pero deben constar por escrito para que puedan verificarse en el curso de una inspección. La inspección forma parte integrante de todo programa de garantía de calidad.

INSPECCIONES DE LA CALIDAD

Las inspecciones son el medio por el cual se determina el rendimiento del programa de GC. En esta sección deberá describirse la finalidad de las inspecciones e indicar cómo deben llevarse a cabo, y por quién.

Las inspecciones de la calidad deberán:

1) planearse con un calendario específico, para que sean más eficaces.

2) documentarse plenamente, registrándose formalmente los resultados e identificándose toda posible acción correctiva.

3) realizarse de conformidad con un programa planeado previamente, y con ánimo positivo.

La persona que lleve a cabo la inspección no deberá ser miembro del laboratorio inspeccionado, pero podrá ser un supervisor o analista de otra sección. Es esencial evitar las autoinspecciones, siempre que sea posible.

El Manual deberá comprender un Programa de Inspección, que habrá de decidir la administración.

EXAMEN DE LOS INFORMES DE INSPECCION

La administración y el equipo de garantía de la calidad se reunirán y pasarán revista a los informes de las inspecciones y otras actividades relacionadas con la calidad. El Manual deberá detallar las materias examinadas y el sistema empleado con esa finalidad.

OTRAS CUESTIONES

En este epígrafe se incluyen otras partes del programa de GC que no se han tratado todavía, así como los requisitos de documentación. Gran parte de ellos se examinan en los Capítulos 5 a 11.

ANEXO 2

Vigilancia de superficies - Método de frotación

1. Cortar esponjas de celulosa en piezas de 5 x 5 cm aproximadamente y someterlas a tratamiento en autoclave en bolsas individuales de papel.

2. Humedecer la esponja esterilizada con unos 10 ml de caldo nutriente o 0,1 por ciento de agua peptonada.

3. Utilizando la técnica aséptica, sujetar la esponja estéril humedecida con pinzas o guantes esterilizados y frotar vigorosamente 1 metro cuadrado de la zona seleccionada.

4. Colocar la esponja en un saco de plástico esterilizado y añadir 100 ml de diluyente.

5. Aplicar un masaje vigoroso a la esponja durante 1 minuto, para que se desprendan los microorganismos.

6. Transferir alícuotas duplicadas de 1 ml al agar de recuento en placa mediante el procedimiento de vertimiento en placas. Hacer las otras diluciones que sean menester.

7. Incubar las placas a 35° durante 48 $\pm$ 2 horas.

8. Calcular el número de microorganismos en el área frotada, la cantidad de diluyente utilizado y el volumen del inoculante en placa. Por ejemplo, si se cuentan 80 colonias en un inoculante de 1-ml obtenido en 100 ml de diluyente, frotada en una zona de 1 metro cuadrado, se comunicará una cifra de 8 000 unidades formadoras de colonias por metro cuadrado.

9. Anotar estos datos en un libro de registro de tapas duras.

ANEXO 3

Vigilancia de superficies - Método del contacto directo del agar con el organismo replicado (RODAC)

1. Las placas de RODAC pueden obtenerse en el comercio o prepararse en el laboratorio. Para preparar las placas en el laboratorio, se llenan cápsulas petri (15 x 100 mm) con agar de recuento en placas, de manera que el menisco del soporte de agar exceda del borde de la placa.

2. Sacar la tapa de la cápsula petri y comprimir la superficie de agar contra la superficie que deberá muestrearse. Una presión circular sobre el reverso de la placa es necesaria para asegurarse de que todo el menisco del agar entra en contacto con la superficie muestreada.

3. Volver a colocar la tapa de la cápsula petri e incubar las placas a 35° durante 48 $\pm$ 2 horas.

4. Contar las colonias y comunicarlas en forma de número de colonias por cm^2 de superficie.

ANEXO 4

Modelo de registro de responsabilidad de la muestra

A. Entrega de la muestra por parte del custodio, y devolución de éste

1. STORAGE LOCATION		2. NAME OF PRODUCT	3. SAMPLE NO.
A. ~~Freezer B~~	C.	Frozen Raw Shrimp	89-79-880
B. Freezer A	D.	4. NAME AND ADDRESS OF RESPONSIBLE FIRM: Johnson Fish Co. Tampa, Florida	☐ CRx/DEA SPL ☐ SPLIT SAMPLE

5. DATE SAMPLE RECEIVED	6A. BY WHOM RECEIVED	6B. DIST/DIV	7. DATE RECORDS REC'D.
1/6/89	Joseph P. Smith (Joseph P. Smith)	DEN-DO	1/6/89

8. METHOD OF SHIPMENT	
A. PERSONALLY FROM	C. SHIPPED FROM
B. VIA (Check one) ☐ PP ☐ BUS ☐ FREIGHT ☒ AIR	D. B/L NO. R-001,451-B

9. DESCRIPTION OF SHIPMENT		NUMBER	TYPE / SIZE, TYPE, ETC.	CONDITION
	A. SHIPPING CONTAINERS	1	Dry Ice Carton	OK
	B. SAMPLE PACKAGES	2	Cardboard Carton	OK
	C. SEAL INSCRIPTION	COPY IN FULL: 89-79-880 1/5/89 Sidney C. Rogers		Intact

10. SAMPLE DELIVERY				11. SAMPLE RETURNED			
DATE	AMOUNT	FROM	TO	DATE	AMOUNT	TO	FROM
1/10/89	2 cartons	JPS	BSW	1/10/89	1 carton	JPS	BSW

12. SAMPLE DISPOSITION	A. DATE SON	B. DATE DESTROYED	C. DESTRUCTION METHOD	D. AMOUNT DESTROYED	E. BY WHOM	F. REASON

Continue on reverse; also record on reverse details for which space is lacking above

SAMPLE ACCOUNTABILITY RECORD

B. Entrega personal por el inspector al analista, y devolución de la muestra al custodio

1. STORAGE LOCATION		2. NAME OF PRODUCT	3. SAMPLE NO.
A. [illegible]	C.	Fresh Spinach	89-01-505
B. Freezer B	D.	4. NAME AND ADDRESS OF RESPONSIBLE FIRM: Southern Vegetable and Fruit Co. Waco, Texas	☐ CRx/DEA SPL ☐ SPLIT SAMPLE

5. DATE SAMPLE RECEIVED	6A. BY WHOM RECEIVED	6B. DIST/DIV	7. DATE RECORDS REC'D.
1/19/89	Janet A. Frances (Janet A. Frances)	CIN-DO	1/19/89

8. METHOD OF SHIPMENT	
A. PERSONALLY FROM: Dorothy R. Hughes	C. SHIPPED FROM
B. VIA (Check one) ☐ PP ☐ BUS ☐ FREIGHT ☐ AIR	D. B/L NO.

9. DESCRIPTION OF SHIPMENT		NUMBER	TYPE / SIZE, TYPE, ETC.	CONDITION
	A. SHIPPING CONTAINERS		None	
	B. SAMPLE PACKAGES	2	Brown paper bag	OK
	C. SEAL INSCRIPTION	COPY IN FULL: 89-01-505 1/18/89 Dorothy R. Hughes		Intact

10. SAMPLE DELIVERY				11. SAMPLE RETURNED			
DATE	AMOUNT	FROM	TO	DATE	AMOUNT	TO	FROM
				1/19/89	3 - 1 qt. carton	BCH	JAF

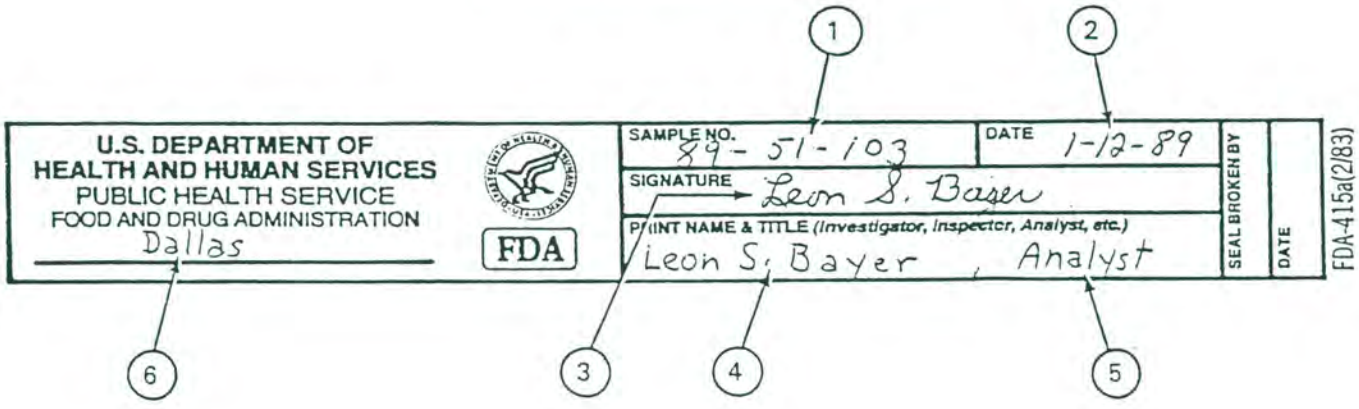
12. SAMPLE DISPOSITION	A. DATE SON	B. DATE DESTROYED	C. DESTRUCTION METHOD	D. AMOUNT DESTROYED	E. BY WHOM	F. REASON

Continue on reverse; also record on reverse details for which space is lacking above

SAMPLE ACCOUNTABILITY RECORD

ANEXO 5

Modelo de precinto de la muestra



1 Anote el número de la muestra. Si procede, utilice prefijos, como "DOC", "INV", etc.

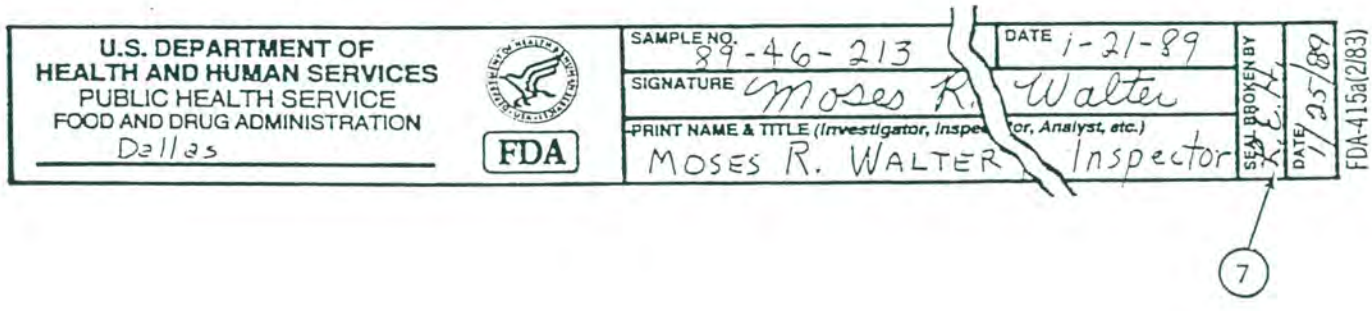
2 Anote la fecha del precintado, con cifras del día, mes y año (véase el punto 7 cuando el precinto se rompe con un propósito determinado).

3 Ponga la firma habitual.

4 Anote el nombre en mayúsculas (si lo desea con un sello de goma, pero procurando que la tinta no se corra).

5 Anote el cargo o título.

6 Indique el distrito con todas las letras (puede hacerse con un sello de goma).



7 Cuando se haya roto el precinto con un propósito determinado, ponga aquí las iniciales y anote la fecha en que se rompió el precinto.

ANEXO 6

Almacenamiento de muestras de alimentos

Alimento	Almacenamiento[a]
Productos de panadería	
Pan, panecillos y bollos listos para comer	Congelación
Pan, panecillos y bollos sin cocer, refrigerados o congelados	Congelación
Productos de pastelería, congelados	Congelación
Tartas listas para comer	Congelación
Masa refrigerada o congelada	Congelación
Galletas y bizcochos	Congelación
Otros productos de panificación	Congelación
Pasteles rellenos de crema o de nata	Congelación
Bebidas y materias para la preparación de bebidas	
Agua	Refrigeración
Bebidas no alcohólicas	Refrigeración
Café instantáneo	Refrigeración
Granos de café	Refrigeración
Té	Refrigeración
Té instantáneo	Refrigeración
Productos de confitería	
Chocolate y productos de cacao	Temperatura ambiente
Azúcar cande y productos de confitería	Temperatura ambiente

Alimento	Almacenamiento[a]
Goma de mascar	Temperatura ambiente
Jarabes y melazas	Refrigeración
Miel	Refrigeración
Azúcar, líquido	Congelación
Azúcar, seco	Congelación
Productos lácteos	
Mantequilla	Refrigeración
Productos de mantequilla (aceite de mantequilla)	Refrigeración
Nata	Refrigeración
Queso	Congelación
Productos de queso	Congelación
Leche entera fluida	Congelación
Productos de leche fluida	Congelación
Productos de leche fluida concentrada	Congelación
Sucedáneos de productos lácteos	Congelación
Leche entera en polvo	Temperatura ambiente
Leche desgrasada en polvo	Temperatura ambiente
Caseína	Temperatura ambiente
Helados	Congelación
Leche helada	Congelación
Polos y sorbetes	Congelación

Alimento	Almacenamiento[a]
Mezclas de helados	Congelación
Mezclas de leche helada	Congelación
Huevos y sus productos	
Huevos y sus productos, líquidos y congelados	Congelación
Huevos en polvo y sus productos	Temperatura ambiente
Huevos en su cáscara	Refrigeración
Pescados, mariscos y crustáceos	
Pescado congelado	Congelación
Pescado fresco	Congelación
Pescado en lata	Refrigeración
Pescado seco	Congelación
Otros productos de pescado (pasta, huevas)	Congelación
Mariscos congelados	Congelación
Mariscos frescos	Congelación
Mariscos en lata	Refrigeración
Mariscos secos	Congelación
Productos del mar (tartas de cangrejo, ensaladas de mariscos)	Congelación
Patas de rana	Congelación
Pescado ahumado	Congelación
Marisco ahumado	Congelación
Crustáceos ahumados	Congelación

Alimento	Almacenamiento[a]
Harinas y productos farináceos	
Macarrones y otras pastas	Temperatura ambiente
Fideos	Temperatura ambiente
Galletas saladas, patatas fritas y alimentos especiales	Temperatura ambiente
Harina	Temperatura ambiente
Harina de maíz	Temperatura ambiente
Mezclas preparadas con contenido de leche y huevos en polvo	Temperatura ambiente
Frutas, jugos de fruta y sus productos	
Frutas frescas	Refrigeración
Frutas congeladas	Congelación
Frutas envasadas	Refrigeración
Frutos secos	Refrigeración
Jugos de fruta	Refrigeración
Jugos de fruta congelados	Congelación
Mermeladas, jaleas, conservas de fruta y pastas	Refrigeración
Pasta de higos	Refrigeración
Aceitunas	Refrigeración
Cereales y productos cerealícolas	
Cereales para desayuno	Temperatura ambiente
Granos y habas enteros	Refrigeración

Alimento	Almacenamiento[a]
Arroz	Temperatura ambiente
Gachas de avena	Temperatura ambiente
Alimentos para niños pequeños	
Cereales para bebés	Refrigeración
Alimentos lácteos deshidratados para bebés	Refrigeración
Alimentos lácteos líquidos para bebés	Refrigeración
Alimentos envasados para bebés	Refrigeración
Carnes, y aves de corral	
Carne y productos cárnicos	Congelación
Aves de corral y sus productos	Congelación
Subproductos varios	
Subproductos de semillas oleaginosas (harina de semillas de algodón)	Refrigeración
Subproductos de animales sacrificados (harina de hueso)	Refrigeración
Subproductos marinos y de pescado (harina de pescado)	Refrigeración
Subproductos de aves de corral	Refrigeración
Subproductos de frutas y hortalizas	Refrigeración
Subproductos lácteos	Refrigeración
Subproductos cereales	Refrigeración
Nueces y sus productos	
Nueces	Refrigeración

Alimento	Almacenamiento[a]
Productos de la nuez	Refrigeración
Alimentos para animales domésticos y piensos	
Piensos, secos	Refrigeración
Piensos, húmedos	Congelación
Piensos en lata	Refrigeración
Alimentos secos para animales domésticos	Refrigeración
Alimentos húmedos para animales domésticos	Congelación
Alimentos en lata para animales domésticos	Refrigeración
Alimentos elaborados y preparados	
Mezclas para postre, secas	Temperatura ambiente
Mezcla de budín, secas	Temperatura ambiente
Comidas completas congeladas	Congelación
Comidas completas en lata	Refrigeración
Ensaladas preparadas	Congelación
Sopas en lata	Refrigeración
Comidas completas deshidratadas	Refrigeración
Gelatina (seca)	Temperatura ambiente
Levadura (seca)	Temperatura ambiente
Especias, aromas y condimentos	
Especias enteras	Temperatura ambiente
Especias molturadas	Temperatura ambiente

Alimento	Almacenamiento[a]
Especias mezcladas	Temperatura ambiente
Extractos y aromas	Refrigeración
Aceites esenciales	Refrigeración
Materias primas para extractos	Refrigeración
Aliño para ensaladas	Refrigeración
Mezcla seca de aliño para ensaladas	Refrigeración
Otros condimentos	Refrigeración
Hortalizas y sus productos	
Hortalizas frescas	Congelación
Hortalizas congeladas	Congelación
Hortalizas en lata	Refrigeración
Hortalizas secas	Temperatura ambiente
Hortalizas en salmuera	Refrigeración
Aceites vegetales	Refrigeración

[a] Las temperaturas de almacenamiento han de ser las siguientes: temperatura ambiente (21°-23°); refrigeración (4°); congelación (-20°).

ANEXO 7

Calibración del termómetro de inmersión parcial

1. Cubrir una bandeja cuentagotas, de un tamaño aproximado de 13 x 23 x 46 cm, con una lámina de plástico flexible. Fijar la lámina a la bandeja con cinta adhesiva para que el cierre sea lo más hermético posible.

2. Practicar un orificio de entrada que pueda volver a cerrarse, para colocar y extraer el termómetro de referencia calibrado por una organización competente de normalización.

3. Añadir 4 litros de agua destilada a la bandeja.

4. Colocar el termómetro de referencia en los soportes de la bandeja de modo que no esté en contacto con ésta.

5. Cerrar el orificio de entrada para evitar la evaporación del agua.

6. Colocar la bola del termómetro que ha de calibrarse lo más cerca posible de la bola del termómetro de referencia.

7. Cerrar la bandeja cuentagotas y colocarla en una incubadora a la temperatura a la que se empleará el termómetro, o a una temperatura muy aproximada a ésta.

8. Dejar que se equilibren los termómetros durante 3 horas por lo menos.

9. Extraer el termómetro que va a calibrarse y leer la temperatura con una lupa, notándola con una aproximación de 0,1°.

10. Extraer de la incubadora la bandeja precintada con el termómetro de referencia.

11. Abrir enseguida el orificio y leer el termómetro de referencia, aún sumergido, con una lupa. Consultar el certificado de corrección del termómetro de referencia para determinar la temperatura verdadera.

12. Determinar el factor de corrección (la cantidad que debe añadirse o deducirse de la temperatura del termómetro que se está calibrando para obtener la temperatura correcta o verdadera).

13. Escribir este factor de corrección y un número de identificación del termómetro en un trozo de cinta adhesiva, y pegarlo al termómetro de inmersión parcial recién calibrado. Anotar esos datos de calibración en el libro de registro en el que figuran los registros de temperatura.

ANEXO 8

Calibración del microscopio

1. Colocar un micrometro ocular con una rejilla de 1 mm y una separación de 10 µm entre cada renglón, en uno de los microscopios oculares (10X de aumento).

2. Colocar un micrometro, de 2 mm de rejilla y una separación de 10 µm entre cada renglón, en la platina del microscopio.

3. Utilizando un objetivo de microscopio de la menor potencia, enfocar el micrometro ocular en el micrometro de la platina.

4. Alinear las dos rejillas, de modo que los renglones del extremo izquierdo de ambas se superpongan.

5. Contar el número de renglones del micrometro de la platina que cubren los 100 renglones del microscopio ocular.

6. Si la ampliación es de 10X, los 100 renglones del micrometro ocular cubrirán 60 renglones (600 µm) del micrometro de la platina, ya que la distancia entre cada renglón del micrometro ocular es de 6 µm.

7. Con una ampliación de 40X, los 100 renglones del micrometro ocular cubren 15 renglones (150 µm) del micrometro de la platina, puesto que la distancia entre cada renglón del micrometro ocular es de 1,5 µm.

8. Con una ampliación de 100X, los 100 renglones del micrometro ocular cubren 6,5 renglones (65 µm) del micrometro de la platina, ya que la distancia entre cada renglón del micrometro ocular es de 0,65 µm.

9. Si un espécimen microbiológico se observa con una ampliación de 100X para abarcar una longitud de 4 renglones y una anchura de 2,5 renglones del micrometro ocular, su longitud y anchura serán de 2,6 µm y 1,63 µm, respectivamente.

ANEXO 9

Determinación de la eficacia bacterial de las lámparas ultravioletas

1. Introducir 20 ml de agar de recuento en placa en cápsulas petri (15 x 100 mm).

2. Preparar una serie de diluciones decuplicadas de un cultivo de Enterobacter aerogenes, de modo que un inoculante de 0,5 ml dé lugar a un recuento de 200-250 colonias por placa.

3. Para cada dilución, aplicar con cuentagotas un volumen de 0,5 ml a las superficies de cuatro cápsulas petri.

4. Rociar el inoculante por igual en toda la superficie del agar, con un rociador de vidrio esterilizado.

5. Repetir el procedimiento con las otras cápsulas petri. Utilizar un rociador de vidrio distinto para cada dilución del cultivo.

6. Sacar las tapas de las cuatro cápsulas petri para cada dilución. Exponer dos de esas cápsulas a la lámpara ultravioleta durante 2 minutos en los puntos que se desee esterilizar. Exponer otras dos cápsulas al alumbrado corriente durante 2 minutos.

7. Cerrar las cápsulas e incubarlas a 35° durante 24-28 horas.

8. Extraer las cápsulas de la incubadora y proceder al recuento. Las placas de la dilución apropiada expuestas al alumbrado del laboratorio deberán contener 200-250 colonias. Las placas que hayan recibido la misma dilución del inoculante, expuestas a la lámpara ultravioleta, deberán acusar una reducción del 99 por ciento en los recuentos. Si la reducción es de menos del 80 por ciento, deberá reemplazarse la lámpara. Anotar esos datos en los libros de registro.

ANEXO 10

Determinación de los residuos bacteriostáticos/bactericidas en las superficies de vidrio del laboratorio

1. Lavar seis cápsulas petri con el procedimiento habitual de lavado del laboratorio, y constituir con ellas el Grupo A.

2. Lavar otras seis cápsulas con el mismo procedimiento, enjuagarlas doce veces con agua destilada y constituir con ellas el Grupo B.

3. Lavar otras seis cápsulas con el procedimiento habitual del laboratorio, secarlas sin más enjuague y clasificarlas como Grupo C.

4. Esterilizar las cápsulas petri de los grupos A, B y C con el procedimiento habitual del laboratorio.

5. Si se desea ensayar las cápsulas petri de plástico preesterilizadas, constituir un Grupo D con seis cápsulas estériles.

6. Añadir a cada cápsula petri 1 ml de dilución pura de cultivo de Enterobacter aerogenes, que proporcionará 50-150 colonias por placa.

7. Añadir a cada placa 20 ml de agar de recuento en placa y mezclarlo bien con el inoculante.

8. Después que se haya producido la solidificación, incubar las placas a 35° durante 48 $\pm$ 2 horas y proceder al recuento.

9. Interpretar el resultado del recuento como sigue:

   a. Una diferencia de menos del 15 por ciento en los recuentos medios en placa para las placas de los grupos A, B, C y D indica que no hay ningún residuo de detergente con propiedades bacteriostáticas o bactericidas, o que las placas preesterilizadas son aceptables.

   b. Una diferencia en el recuento de las colonias de más del 15 por ciento entre los grupos A y B o D y B indica la presencia de residuos inhibitorios de detergente.

   c. Una diferencia en el recuento de menos del 15 por ciento entre los grupos A y B, y de más del 15 por ciento entre los grupos A y C, indica que el detergente tiene propiedades inhibitorias que desaparecen con el lavado ordinario.

ANEXO 11

Determinación de la idoneidad del agua para la preparación de medios y reactivos microbiológicos

Principio

Este procedimiento se basa en la proliferación de un cultivo de 24 horas de Enterobacter aerogenes en un medio de proliferación mínima, químicamente definido. Si la proliferación de este cultivo es de un 20 por ciento más o menos que la de un cultivo de control, se concluirá que el agua contiene un estimulador del crecimiento o un agente inhibidor, respectivamente.

Instrumental de vidrio

Sólo deberá utilizarse cristal de borosilicato que se haya enjuagado a fondo con agua destilada antes de la esterilización con aire seco y caliente.

Reactivos

Deberán utilizarse productos químicos de la máxima pureza. Los reactivos se preparan en agua recién destilada en un destilador de vidrio. Hacen falta los siguientes reactivos:

a) Solución de citrato de sodio. Disolver 0,29 g de citrato de sodio, $Na_3C_6H_6O_7 \cdot 2H_2O$ en 500 ml de agua.

b) Solución de sulfato de amonio. Disolver 0,60 g de sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$, en 500 ml de agua.

c) Solución de sales mezcladas. Disolver 0,26 g de sulfato de magnesio $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,17 g de cloruro de calcio, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,23 g de sulfato ferroso, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, y 2,50 g de cloruro de sodio, NaCl, en 500 ml de agua.

d) Solución reguladora de base de fosfato. Disolver 34,0 g de fosfato dihidropotásico, KH_2PO_4, en 500 ml de agua destilada, ajustar a 7,2 $\pm$ 0,5 pH con 1 N de hidróxido de sodio, HaOH, y diluir en 1 litro de agua destilada.

e) Solución reguladora de fosfato. Diluir 1:25 de la solución reguladora de base en agua destilada.

Hervir las soluciones de base durante 1 ó 2 minutos para destruir las células bacteriales vegetativas; almacenar a oscuras en frascos estériles con tapón de vidrio, a 5°, durante 3 meses. Antes de utilizar estas soluciones, habrá que verificar su esterilidad. La solución de sales mezcladas se enturbiará a los 3-5 días de su preparación, al convertirse la sal ferrosa al estado férrico. Si se desea un almacenamiento prolongado, la solución de sales mezcladas deberá prepararse sin el sulfato ferroso. Inmediatamente antes del uso, añádase la cantidad adecuada de sulfato ferroso para completar la

fórmula de la solución de sales mezcladas. No deberá emplearse ninguna solución que presente síntomas de enturbiamiento.

Muestras

Recoger aproximadamente 200 ml de agua de calidad desconocida y 200 ml de agua de control en frascos de cristal de borosilicato, y hervirlas durante 1 ó 2 minutos solamente, para impedir los cambios químicos en el agua. Volver a destilar el agua de control para satisfacer las siguientes especificaciones: conductividad >0,5 megohmios de resistencia o <2 µmhos/cm a 25°, pH 5,5-7,5, carbono orgánico total <1,0 mg/litro, monometales pesados (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn) <0,5 mg/litro, total de metales pesados, ≤1,0 mg/litro, amonio/nitrógeno orgánico <0,1 mg/litro, total de cloro residual por debajo del límite de detección, y recuento en placa heterotrófica <1 000 colonias/ml.

Preparación de los componentes del frasco

Preparar cinco frascos con los componentes indicados en el Cuadro 1.

Preparación del inóculo de E. aerogenes

El día antes del comienzo de la prueba de idoneidad, inocular un cepo de E. aerogenes en agar nutriente con una inclinación aproximada de 6,3 cm, en un tubo de 16 x 125 mm con tapón de rosca. Esparcir en estrías uniformemente por toda la superficie e incubar durante 18-24 horas a 35°. Aplicar con cuentagotas al cultivo 1-2 ml de agua estéril de dilución de un recipiente de 99 ml y emulsificar suavemente con el cuentagotas. Volver a introducir la suspensión con cuentagotas en el recipiente de agua de 99 ml. Hacer una dilución de 1:100 del segundo frasco en un tercer recipiente de agua, y una dilución de 1:10 del tercer frasco en un cuarto recipiente de agua. Este procedimiento ha de dar lugar a una suspensión que contenga de 30 a 80 células viables por ml. Introducir con cuentagotas 1,0 ml de la cuarta dilución ($1:10^5$) en cada frasco, como se indica en el Cuadro 1.

Verificar la densidad celular mediante una serie de recuentos en placa de la tercera dilución. Elegir el volumen adecuado de esta tercera dilución que, diluido con los 30 ml en los frascos A, B, C, D y E, contendrá de 30 a 80 células viables por ml.

Cálculos

Para determinar la presencia de una sustancia inhibidora del crecimiento, se utiliza el siguiente coeficiente:

$$\text{Coeficiente} = \frac{\text{recuento de colonias/ml, frasco B}}{\text{recuento de colonias/ml, frasco A}}$$

Un coeficiente de 0,8-1,2 indica que no hay sustancias inhibidoras presentes en el agua. Un coeficiente de menos de 0,8 indica la presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento, mientras que un coeficiente de más del 1,2 indica la presencia de fuentes estimuladoras del crecimiento en agua.

Para determinar la presencia de fuentes de nitrógeno y carbono estimuladoras del crecimiento, se aplicará la siguiente fórmula:

$$\text{Coeficiente} = \frac{\text{recuento de colonias/ml, frasco C}}{\text{recuento de colonias/ml, frasco A}}$$

Para determinar las fuentes de nitrógeno estimuladoras del crecimiento, se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Coeficiente} = \frac{\text{recuento de colonias/ml, frasco D}}{\text{recuento de colonias/ml, frasco A}}$$

Para determinar las fuentes de carbono estimuladoras del crecimiento, se utilizará la siguiente fórmula:

$$\text{Coeficiente} = \frac{\text{recuento de colonias/ml, frasco E}}{\text{recuento de colonias/ml, frasco A}}$$

Interpretación de los resultados

Cuando el coeficiente del recuento de colonias del frasco B/frasco A es de más de 1,2, puede suponerse que están presentes sustancias estimuladoras del crecimiento. Sin embargo, éste es un procedimiento muy sensible y, en la práctica, los coeficientes de hasta 3,0 tienen poca importancia. Así pues, para coeficientes de 1,2 a 3,0 no se efectúan los ensayos C, D y E (Cuadro 1).

Cuando el coeficiente del recuento de colonias del frasco B/frasco A es inferior a 0,8, puede suponerse que hay sustancias tóxicas en el agua. Este ensayo incluye todas las tolerancias permisibles, y cuando el coeficiente es de menos de 0,8 deben tomarse medidas correctivas de inmediato, entre ellas una inspección del equipo de destilación y un examen cuidadoso de la producción y el manejo del agua destilada.

Cuadro 1. Componentes del frasco para el ensayo de idoneidad del agua*

	Ensayo de control (ml)		Ensayos optativos (ml)		
Componente	Control	Agua destilada desconocida	Alimento disponible	Fuente de nitrógeno	Fuente de carbono
	A	B	C	D	E
Solución de citrato de sodio	2,5	2,5	-	2,5	-
Solución de sulfato de amonio	2,5	2,5	-	-	2,5
Solución de sales mezcladas	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Solución reguladora de fosfato (pH 7,3±0,1)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Muestra de agua desconocida	-	21,0	21,0	21,0	21,0
Control de agua redestilada	21,0	-	5,0	2,5	2,5
Volumen total por frasco	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0

* De la referencia 3, Geldreich, E.E. y H.F Clark,, 1965. J. Milk Food Technol. 28:351-355. Reproducido con permiso del editor.

ANEXO 12

Conservación de cultivos microbiológicos de base

Bacillus cereus

A. Períodos breves

1. Inocular agar nutriente inclinado e incubar a 30-35° durante 24 ± 2 horas.
2. Mantener a temperatura ambiente (21-23°) durante 1 ó 2 días más para que se complete la esporulación.
3. Refrigerar el caldo de cultivo a 4°.
4. Hacer subcultivos cada 6 meses.

B. Larga duración

1. Inocular agar nutriente inclinado e incubar a 30-35° durante 24 ± 2 horas.
2. Mantener a temperatura ambiente (21-23°) durante 1 ó 2 días más para que se complete la esporulación.
3. Suspender la proliferación del agar inclinado con agua destilada y mezclar (1:1) con una solución al 20 por ciento de sal glicerinada. Preparar esta solución disolviendo 4,2 g de NaCl y aumentando el volumen hasta 800 ml con agua destilada. Añadir 12,4 de K_2HPO_4 (anhidro), 4,0 g de KH_2PO_4 (anhidro) y 200 ml de glicerina (grado reactivo). Ajustar el pH a 7,2 y tratar en autoclave durante 15 minutos a 121°.
4. Congelar volúmenes de 3 ml de una mezcla (1:1) inmediatamente en CO_2 sólido o en un congelador de alta potencia y almacenar a una temperatura comprendida entre -55° y -90°.
5. Hacer subcultivos cada 2 años.

Campylobacter jejuni

Para todas las incubaciones deberá emplearse una atmósfera modificada de 85 por ciento de N_2, 10 por ciento de CO_2 y 5 por ciento de O_2.

A. Períodos breves

1. Inocular un tubo que contenga 10 ml de un caldo de casaminoácidos-extracto de levadura-sales. Preparar este caldo disolviendo los siguientes ingredientes en 1 litro de agua destilada: 20 g de casaminoácidos, 6 g de extracto de levadura, 2,5 g de NaCl y 8,71 g de K_2HPO_4 (anhidro). Ajustar el pH de modo que su valor después del autoclave sea 8,5 ± 0,2. Tratar en autoclave durante 15 minutos a 121°.

2. Incubar el soporte inoculado a 41-44° durante 48 ± 2 horas.
3. Extender en estrías el caldo de cultivo en placas inclinadas de agar de chocolate o de sangre, e incubar a 41-44° durante 48 ± 2 horas.
4. Hacer subcultivos semanalmente.

B. Larga duración

1. Inocular un tubo que contenga 10 ml de caldo de casaminoácidos-extracto de levadura-sales e incubar a 41-44° durante 48 ± 2 horas.
2. Preparar el cultivo añadir glicerol a una concentración final al 10-20 por ciento.
3. Congelar porciones de 2-3 ml a -70° o una temperatura inferior.
4. Hacer subcultivos cada 6 meses.

Clostridium botulinum

A. Períodos breves

1. Inocular un medio de carne cocida desaireada o un caldo de tripticasa-peptona-glucosa-extracto de levadura con tripsina (TPGLT) e incubar a 26-35° según el tipo de cepa cultivada. El medio de carne cocida, incubado a 35°, es preferible para las cepas proteolíticas de los tipos A, B, F y G. El TPGLT, incubado a 26°, es preferible para los tipos no proteolíticos B, E y F.

   Para preparar el medio de carne cocida, añadir 12,5 g de un medio comercial a 100 ml de agua destilada fría. Mezclar y dejar reposar durante 15 minutos para que las partículas se empapen. Otro procedimiento es distribuir 1,25 g de un medio comercial en tubos (20 x 150 mm) añadir 10 ml de agua destilada fría y mezclar a fondo para que se mojen todas las partículas. Tratamiento en autoclave durante 20 minutos a 121°. El pH final ha de ser 7,2 ± 0,2.

   El TPGLT no se encuentra en el comercio y ha de hacerse con los diversos ingredientes. Para preparar la base, disolver los siguientes ingredientes en 1 litro de agua destilada: 50 g de tripticasa, 5 g de peptona, 20 g de extracto de levadura, 4 g de glucosa y 1 g de tioglicolato de sodio. Introducir porciones de 15 ml en tubos (20 x 150 mm) y someter a tratamiento en autoclave durante 10 minutos a 121°. El pH final ha de ser 7,0 ± 0,2. Refrigerar el medio esterilizado y añadir tripsina inmediatamente antes del uso.

   Para preparar la solución de tripsina, añadir 1,5 g de tripsina (1:250, Difco) a 100 ml de agua destilada. Agitar la tripsina en el agua para provocar la suspensión. Dejar que las partículas se posen y filtrar-esterilizar el sobrenadante a través de una membrana de 0,45 µm.

Antes del uso, hervir o tratar al vapor la base durante 10 minutos para expulsar el oxígeno disuelto. Añadir 1 ml de solución de tripsina a cada 15 ml de base.

2. Incubar el soporte inoculado durante 5 días o más a las temperaturas indicadas.
3. Almacenar a 4° durante 6 meses.

B. Larga duración

1. Extender en estrías el cultivo en el caldo como se indica anteriormente.
2. Centrifugar una porción de cultivo TPGLT en tubos centrífugos estériles para sedimentar las esporas.
3. Lavar dos veces las esporas en suspensión con 10-20 ml de agua destilada estéril.
4. Volver a suspender las esporas lavadas en agua destilada estéril y almacenar a 4°.
5. Las esporas en suspensión deben permanecer estables durante 10-20 años.

<u>Clostridium perfringens</u>

A. Períodos breves

1. Inocular un tubo que contenga 10 ml de caldo de tioglicolato fluido (desaireado) recién tratado al vapor e incubar aeróbicamente a 35-37° durante 18-20 horas.
2. Hacer un subcultivo de un medio de carne cocida desaireada e incubar aeróbicamente a 35-37° durante 24 $\pm$ 2 horas.
3. Mantener a temperatura ambiente (21-23°) durante 1 ó 2 días más para que se complete la esporulación.
4. Refrigerar el caldo de cultivo a 4°.
5. Hacer subcultivos cada 30 días.

B. Larga duración

1. Inocular un tubo que contenga caldo de tripticasa-peptona-glucosa-extracto de levadura (regulado). Preparar este medio disolviendo los siguientes ingredientes en 1 litro de agua destilada: 50,0 g de tripticasa, 5,0 g de peptona, 20,0 g de extracto de levadura, 4,0 g de glucosa, 5,0 g de Na_2HPO_4 y 1,0 g de tioglicolato de sodio. Ajustar el medio a 7,3 $\pm$ 0,2 pH; introducir porciones de 15 ml en tubos (20 x 150 mm) y tratar en autoclave durante 8 minutos a 121°. Refrigerar el medio sometido a tratamiento en autoclave hasta la utilización.

2. Incubar el medio inoculado durante 18 horas a 35-37°.
3. Añadir una parte de caldo de cultivo a 1 parte de leche desnatada estéril y liofilizar porciones de 1-2 ml. Otro procedimiento sería añadir 1 parte de caldo de cultivo a 1 parte de solución al 10 por ciento de sal glicerinada. Preparar la solución disolviendo 4,2 g de NaCl y aumentando el volumen a 900 ml con agua destilada. Añadir 12,2 g K_2HPO_4 (anhidro), 4,0 g de KH_2PO_4 (anhidro) y 100 ml de glicerina (grado reactivo). Ajustar el pH a 7,2 $\pm$ 0,2 y tratar en autoclave durante 15 minutos a 121°.
4. Congelar volúmenes de 1-3 ml de una mezcla (1:1) de cultivo y solución de sal glicerinada utilizando CO_2 sólido y un congelador de alta potencia. Almacenar a una temperatura comprendida entre -55° y -90°.
5. Hacer subcultivos cada 2 años.

<u>Escherichia coli</u>

A. Períodos breves

1. Inocular un agar inclinado de infusión de sesos y corazón e incubar a 35° durante 2 horas.
2. Refrigerar el cultivo inclinado a 4°.
3. Hacer subcultivos mensuales.

B. Larga duración

1. Inocular un agar inclinado de infusión de sesos y corazón e incubar a 35° durante 24 $\pm$ 2 horas.
2. Hacer un subcultivo de la proliferación en un tubo que contenga 10 ml de caldo de infusión de sesos y corazón.
3. Incubar a 35° durante 24 $\pm$ 2 horas.
4. Centrifugar la suspensión celular y lavar dos veces las células con volúmenes de 10 ml de solución reguladora fosfatada de Butterfield.
5. Dejar en suspensión las células lavadas en una solución reguladora fosfatada de Butterfield de 10 ml.
6. A 1 parte de las células lavadas en suspensión, añadir 1 parte de leche desnatada desgrasada reconstituida de doble potencia, que se prepara disolviendo 200 g de leche desnatada en polvo desgrasada en 1 litro de agua destilada y sometiendo la solución al tratamiento en autoclave durante 15 minutos a 121°.
7. Congelar en profundidad y liofilizar porciones de 1 a 2 ml de esta mezcla (1:1).
8. El cultivo permanecerá estable durante 4-5 años a la temperatura ambiente (21-23°).

Listeria monocytogenes

A. Períodos breves

1. Inocular un tubo que contenga 10 ml de caldo de soja y tripticasa con 0,6 por ciento de extracto de levadura o 10 ml de caldo de fosfato y triptosa.
2. Incubar a 30-35° durante 48 ± 2 horas.
3. Hacer un subcultivo de caldo en un agar inclinado de soja de tripticasa en 0,6 por ciento de extracto de levadura o un agar nutriente inclinado.
4. Incubar a 30-35° durante 48 ± 2 horas.
5. Refrigerar el cultivo inclinado a 4°.
6. Hacer subcultivos mensuales.

B. Larga duración

1. Inocular un tubo que contenga 10 ml de caldo de soja y tripticasa con 0,6 por ciento de extracto de levadura o 10 ml de caldo de fosfato y triptosa.
2. Incubar a 30-35° durante 48 ± 2 horas.
3. Añadir glicerol al caldo de cultivo en una concentración final del 10 por ciento.
4. Congelar volúmenes de 2 a 3 ml a -70° como mínimo.
5. Hacer subcultivos cada 6 meses.

Salmonella

A. Períodos breves

1. Inocular agar inclinado de infusión de sesos y corazón e incubar a 35° durante 24 ± 2 horas.
2. Mantener el cultivo a oscuras, a la temperatura ambiente (21-23°).
3. Hacer subcultivos cada 2 semanas.

B. Larga duración

No se recomienda la liofilización para el almacenamiento de cultivos de salmonella por períodos largos, porque los antígenes flagelares y somáticos podrían sufrir daños.

1. Introducir agar inclinado de sangre para conseguir la proliferación en la mayor parte de la superficie e incubar a 35° durante 24 ± 2 horas.
2. Recoger la proliferación de la superficie inclinada con un asa de platino estéril.
3. Con la proliferación, inocular un tubo que contenga agar de base de tripticasa semisólido (sin rojo fenol). Preparar este medio disolviendo 20,0 g de tripticasa y 3,5 g de agar en 1 litro de agua. Introducir de 1 a 2 ml en tubos (10 x 75 mm) cubiertos con papel de estaño. Esterilizar los tubos a 116-118° (con una presión no superior a 12 libras) durante 15 minutos. Cuando se hayan enfriado, precintar asépticamente los tubos con tapones de corcho que hayan sido sumergidos en parafina hirviente durante 5 minutos.

4. Incubar los tubos inoculados a 35° durante 24 ± 2 horas.
5. Almacenar los cultivos a oscuras, a la temperatura ambiente (21-23°).
6. Hacer subcultivos cada 3 años.

Shigella

A. Períodos breves

El mismo procedimiento que con el E. coli.

B. Larga duración

El mismo procedimiento que con el E. coli.

Staphylococcus aureus

A. Períodos breves

1. Inocular un tubo que contenga 10 ml de caldo de soja y tripticasa e incubar a 35° durante 24 ± 2 horas.
2. Esparcir en estrías el caldo de cultivo en un agar inclinado de soja y tripticasa e incubar a 35° durante 24 ± 2 horas.
3. Almacenar a la temperatura ambiente (21-23°).
4. Hacer subcultivos semanales.

B. Larga duración

1. Inocular un tubo que contenga 10 ml de caldo de soja y tripticasa e incubar a 35° durante 24 ± 2 horas.
2. Añadir glicerol a la concentración final al 20 por ciento y congelar porciones de 2 a 3 ml a -80°. Otro procedimiento consistiría en añadir una cantidad suficiente de aceite mineral estéril para sumergir el cultivo de agar inclinado de soja y tripticasa.
3. Para ambos tipos de conservación de cultivos a largo plazo, hacer subcultivos anuales.
4. Otro procedimiento consistiría en añadir 2 ml de cultivo de caldo de soja y tripticasa (6 a 12 horas) a 2 ml de glicerol estéril al 80 por ciento en un criotubo y congelar inmediatamente a -70°. Hacer subcultivos a intervalos de 6 meses.

Vibrio cholerae

A. Períodos breves

1. Inocular un tubo con un medio de T_1N_1 haciendo una incisión profunda en el medio. Preparar el medio disolviendo los siguientes ingredientes por litro de agua destilada: 10 g de tripticasa, 10 g de NaCl y 20 g de agar. Introducir porciones de 4 ml en tubos de tapón a rosca (13 x 100 mm). Tratar en autoclave durante 15 minutos a 121°. No hace falta ningún ajuste del pH.
2. Desenroscar e incubar los tubos inoculados a 35° durante 24 $\pm$ 2 horas.
3. Enroscar los tapones y almacenar a 4°.
4. Hacer subcultivos semanales.

B. Larga duración

1. Inocular un tubo que contenga 10 ml de caldo de T_1N_1 e incubar a 35° durante 6-12 horas.
2. Añadir 2 ml de cultivo de caldo de T_1N_1 de 6 a 12 horas en 2 ml de glicerol estéril al 80 por ciento en un criotubo, y congelar inmediatamente a -70°.
3. Hacer subcultivos a intervalos de 6 meses.

Vibrio parahaemolyticus

A. Períodos breves

1. Inocular un tubo de un soporte de preservación practicando una incisión profunda en el medio semisólido. Preparar el medio disolviendo los siguientes ingredientes por litro de agua destilada: 3 g de extracto de levadura, 10 g de peptona, 30 g de NaCl, y 3 g de agar. Introducir porciones de 4 ml en tubos de tapón de rosca (13 x 100 mm). Tratar en autoclave durante 15 minutos a 121°. No hace falta ningún ajuste del pH.
2. Desenroscar los tapones e incubar los tubos inoculados a 35° durante 24 $\pm$ 2 horas.
3. Enroscar los tapones almacenados a la temperatura ambiente (21-23°) únicamente. No refrigerar.
4. Hacer subcultivos semanales.

B. Larga duración

1. Inocular un tubo que contenga 10 ml de caldo de soja y tripticasa con NaCl al 3 por ciento (concentración final) e incubar a 35° durante 6-12 horas.
2. Mezclar 0,09 ml de dimetilsufóxido estéril con 1 ml de caldo de cultivo en criotubos estériles y congelar de inmediato a -70°.
3. Hacer subcultivos cada 6 meses.

Vibrio vulnificus

El mismo procedimiento que para el V. parahaemolyticus.

Levadura y mohos

A. Períodos breves

Antes de hacer subcultivos, examinar visualmente los cultivos para determinar la posible contaminación procedente de otros mohos o levaduras. Determinar la presencia de acáridos con el microscopio de disección.

1. Hacer una extensión en estrías en una placa que contenga 30 ml de agar de dextrosa de patata suplementado con ácido tartárico o antibióticos, como se describe más abajo. Los antibióticos son preferibles al ácido tartárico porque las soluciones madre son relativamente fáciles de preparar y no dan lugar a un pH bajo, que inhíbe algunas especies de levaduras y mohos.

   Emplear una solución al 10 por ciento de ácido tartárico para ajustar el medio de agar a 3,5 $\pm$ 0,1 pH. Esterilizar la solución filtrándola por una membrana de 0,45 µm. Dosificar para determinar el volumen que hace falta para ajustar el pH a 3,5. Después de añadir la solución, verificar el pH dejando que una porción del medio se solidifique haciendo una comprobación con un medidor de pH.

   El antibiótico preferido es la clortetraciclina-HCl, a una concentración de 40 ppm. Otros antibióticos, como el cloramfenicol o la estreptomicina, pueden emplearse también pero siempre con la misma concentración que la clortetraciclina-HCl, y adicionalmente a ésta. Preparar la solución madre de antibiótico disolviendo 1 g de antibiótico en 100 ml de agua destilada estéril y filtrando por una membrana de 0,45 µm. Almacenar las soluciones en la oscuridad a 4-8°. La validez para el uso no excede de 1 mes. Equilibrar las soluciones madre a la temperatura ambiente (21-23°) inmediatamente antes de utilizarlas. Si el medio de agar está en alícuotas de 250 ml, añadir 1 ml de solución madre en 100 ml para obtener una concentración de 40-ppm. Con otros volúmenes de agar de dextrosa de patata derretida, añadir un volumen proporcional de solución de antibiótico.

2. Incubar la placa de agar a 22-25° hasta que se hayan desarrollado colonias de 3-5 cm (aproximadamente 1 semana para los mohos y 2 semanas para las levaduras).
3. Elegir una colonia aislada del agar inclinado de dextrosa de patata suplementado con ácido tartárico o antibióticos, como se ha descrito anteriormente.

4. Incubar tubos a 22-25° durante 1 semana (mohos) y 2 semanas (levaduras).
5. Refrigerar los cultivos a 4°.
6. Hacer subcultivos cada dos meses.

B. Larga duración

1. Inocular un agar inclinado de dextrosa de patata suplementada con ácido tartárico o con antibióticos, como se ha descrito anteriormente.
2. Incubar los tubos a 22-25° durante 1 semana (mohos) o 2 semanas (levaduras).
3. Sumergir el cultivo de agar en aceite mineral estéril o glicerol.
4. Almacenar a 4°.
5. Hacer subcultivos cada 6 meses.
6. Otro procedimiento consistiría en sumergir activamente el cultivo inclinado de agar que está proliferando en agua destilada estéril. Hacer girar la placa para que las esporas/células permanezcan en suspensión.
7. Transferir 1 ml de suspensión a la probeta que contiene 5 g de fango arcilloso estéril (tratamiento en autoclave durante 1 hora a 121°).
8. Almacenar a 4°.
9. Hacer subcultivos anuales.

Yersinia enterocolitica

Los plasmidos de patogenicidad pueden perderse si los cultivos se incuban a más de 30° o si se efectúan subcultivos con demasiada frecuencia.

A. Períodos breves

1. Inocular un tubo que contenga 10 ml de caldo de infusión de carne de ternera o de sesos y corazón e incubar a 26° durante 48 $\pm$ 2 horas.
2. Extender en estrías el caldo de cultivo en un agar inclinado de soja y tripticasa e incubar a 26° durante 48 $\pm$ 2 horas.
3. Almacenar a oscuras a la temperatura ambiente.
4. Hacer subcultivos mensuales.

B. Larga duración

1. Inocular un tubo que contenga 10 ml de infusión de carne de ternera o de sesos y corazón e incubar a 26° durante 48 $\pm$ 2 horas.
2. Añadir glicerol a la concentración final al 10-20 por ciento.
3. Congelar porciones de 2 a 3 ml a -70° como mínimo.
4. Hacer subcultivos cada 4-6 meses.

ANEXO 13

Modelo de Certificado de Sanidad Animal

CERTIFICADO DE SANIDAD ANIMAL

TRANSPORTE:
FECHA _____ VENDEDOR _____ PEDIDO DE COMPRA No. _____

RECEPCION:
FECHA _____ HORA _____ HABITACION No. _____

PERSONA RECEPTORA _____

DESCRIPCION:
ESPECIE _____ RAZA _____ NUMERO _____

PESO _____ SEXO _____

ESTADO DE LOS ANIMALES: _____

CUARANTENA:
FECHA DE INICIO _____ FECHA DE TERMINACION _____ HABITACION No. _____

OBSERVACIONES _____

PRUEBAS DE DIAGNOSTICO EFECTUADAS: _____

DISPOSICION: _____

DIRECTOR DEL ESTUDIO: _____ PROYECTO No. _____

_____
OFICIAL MEDICO VETERINARIO

FECHA _____

ANEXO 14

Procedimiento para sujetar a los ratones y aplicarles una inyección intraperitoneal

1. Llenar la jeringa con el volumen apropiado del inóculo que desee inyectarse. Dejarla a un lado.

2. Agarrar al ratón cerca de la base de la cola. No sujetar al animal por la cola durante mucho tiempo, porque le produciría un estado de tensión.

3. Sacar al ratón de la jaula y colocarlo sobre una superficie firme.

4. Mientras una mano sujeta la base de la cola, agarrar con la otra al animal por la piel de la nuca.

5. Con la misma mano que agarra la nuca, colocar la cola del ratón entre los dedos del analista para sujetar y controlar al animal.

6. Sujetando bien al ratón con una mano, frotar con la otra la zona que habrá de inyectarse con etanol al 70 por ciento.

7. Introducir la aguja en el cuadrante inferior izquierdo o derecho del abdomen en un ángulo de 30°. En esta parte del cuerpo del animal no hay órganos vitales.

8. Aspirar suavemente la jeringa para verificar que se ha inyectado en el lugar adecuado. Cualquier señal de sangre o de fluido denota una inyección defectuosa, y la aguja deberá extraerse y volverse a introducir.

9. Inyectar el inóculo con un movimiento regular continuo.

10. Una vez efectuada la inyección, colocar de inmediato la jeringa y la aguja en un envase a prueba de perforaciones, tratarlos en autoclave y eliminarlos.

11. Después de la inoculación, frotar el lugar de la inyección con etanol al 70 por ciento.

ANEXO 15

Procedimientos para provocar la muerte indolora a los ratones

A. Dislocación cervical

1. Agarrar al ratón cerca de la base de la cola.

2. Sacar al ratón de la jaula y colocarlo sobre una superficie firme.

3. Tirar suavemente, pero con firmeza, de la cola hasta que el ratón adopte una posición distendida.

4. Apoyar firmemente una barra de metal, como unas tijeras o un fórceps, en la nuca del animal.

5. Tirar brúscamente de la cola hacia arriba para dislocar el cuello y provocar la muerte inmediata.

B. Gaseamiento con dióxido de carbono

1. Podrá emplearse un secador del laboratorio como cámara de gas. Colocar hielo seco debajo de la plataforma interior del secador. El hielo seco no debe entrar en contacto directo con los ratones.

2. Vertir una cantidad de agua caliente sobre el hielo seco para generar gas de dióxido de carbono.

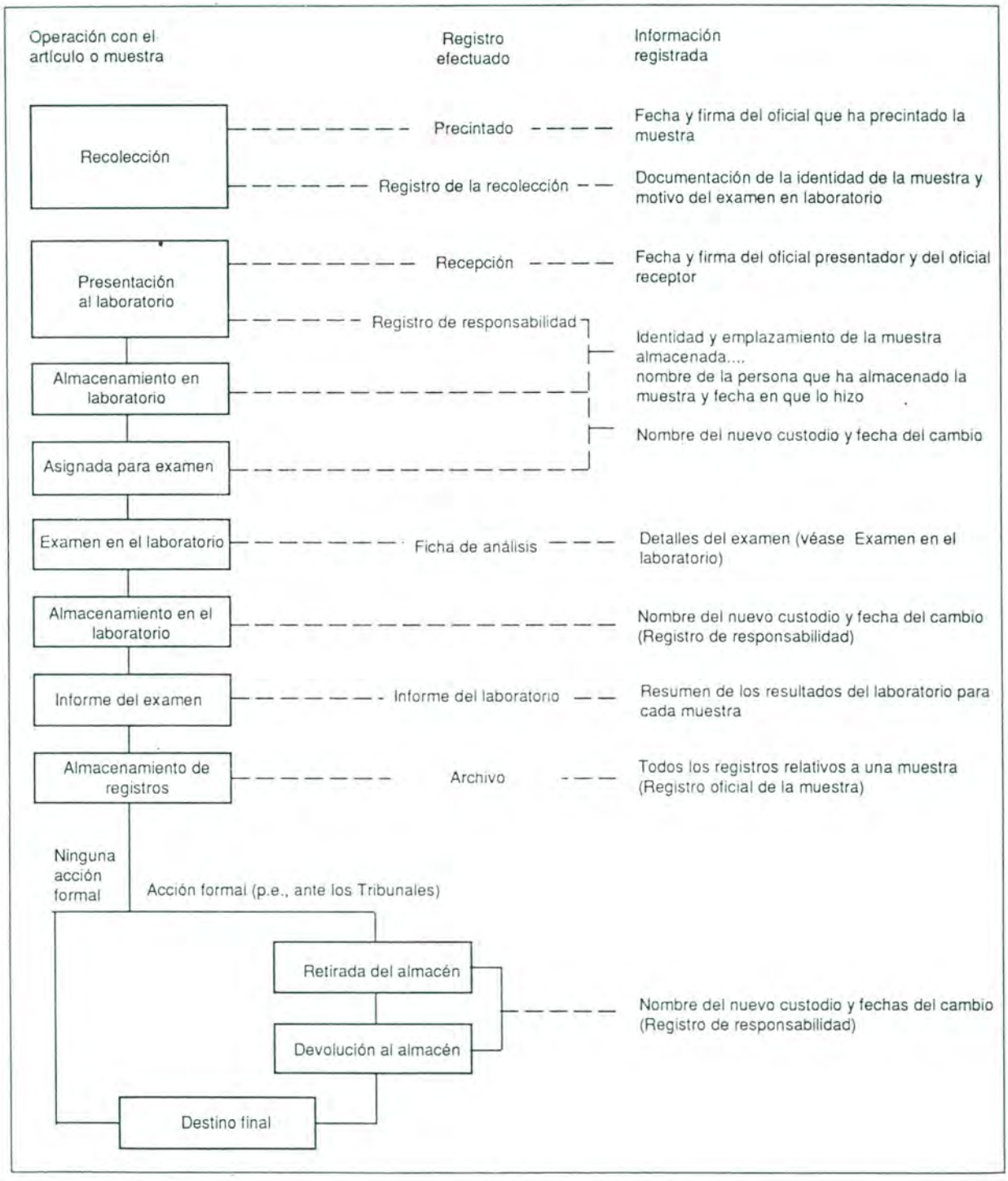
3. Colocar de nuevo la tapa del secador para crear un espacio herméticamente cerrado.

4. Dejar que el gas de dióxido de carbono sature el interior del secador.

5. Desplazar parcialmente la tapa para introducir los ratones en la cámara saturada de dióxido de carbono, y cerrar de inmediato.

ANEXO 16

Modelo de organigrama de la presentación de muestras al laboratorio para su examen



Tomado de "Optimizing Chemical Laboratory Performance Through the Application of Quality Assurance Principles", de Frederick M. Garfield, Nancy Palmer y George Schwartzman, Eds. Actas de un simposio de la Association of Official Analytical Chemists, 94ª Reunión Anual, 22-23 de octubre 1980, Washington D.C. Reproducido con la autorización del editor.

ANEXO 17

Modelo de informe de recolección

1. FLAG SURVEILLANCE ☐ COMPLIANCE ☐ Dealer voluntarily holding thru 10-30-89				2. TYPE SAMPLE	3. SAMPLE NUMBER 8 9 — 180-121	
4. CF NO. 2289653	5. DATE COLLECTED 10-15-89		6. PRODUCT CODE 54AFA03	7. RESP FIRM M	8. PROGRAM ASSIGN CODE 1. 56008A 2. 3.	9. HOURS 1. 5 2. 3.
10. RELATED SPL None	11. PC 2	12. COLL NO. 057	13. SPLING DIST BOS	14. COLL DIST BOS		

15. PRODUCT NAME AND IDENTIFICATION *(Quote pertinent labeling including firm name and address)*

Vitamin B_2 Human Non-Rx. Glass bottle lbld in part with stickon label "Bolton's 500 CT Riboflavin tablets 5 milligram******
Distributed by Bolton Pharmacals, Inc., Portland, Maine 04111**"

Bottles in cardboard case, case labeled in part "12-500 bottles**
Bolton Riboflavin**"

16. REASON FOR COLLECTION *(Indicate analysis needed & document assignment. Include CP No. and/or Assignment No. if applicable.)*

NYK/BOS memo 10-10-89, Label mix-up. Check identity.

17. MFG CODES *(Labels, pkg, shipping containers)*
Bottle label "71921"
Shipping carton "71921-4"

18. MANUFACTURER *(Name, address & ZIP)*	19. SHIPPER *(Name, address & ZIP)*	20. DEALER *(Name, address, ZIP & telephone)*
Margo Drug Co. 2747 Pine St. Yonkers, New York 10701	same as #18	Mercy Hospital Pharmacy 1500 Quincy Avenue Portland, Maine 04111 207-632-5687

21. SIZE OF LOT FROM WHICH SAMPLED	22. EST VALUE	23. RECEIPT ISSUED			24. DATE SHIPPED & DOC REF
		FDA472	FDA484	NONE	
2 cases/12/500 tab bottles & 3/500 tab bottles. Stock from same *	$32.00			XXX	10/9/89 F/B

25. DESCRIPTION OF SAMPLE AND METHOD OF COLLECTION *(Number and size of units, etc.)*

Three 500 tablet bottles, taken at random from shelf stock, all of same code.

26. HOW PREPARED
Each bottle label identified as on line #27. All three bottles wrapped together in brown paper bag with padding and bag off. Sealed as on line #28. Packed to ship.

27. COLL IDENT ON PKG AND/OR LABEL	28. COLLECTOR'S IDENTIFICATION ON SEAL
"89-180-121 10-15-89 SHR"	"89-180-121 10-15-89 Sylvia H. Rogers"

29. SAMPLE DELIVERED TO	30. DATE DELIVERED	31. LAB
P.P. Portland, Maine	10-15-89	NYK
	32. LAB W/SPLIT SAMPLE	33. ORIG C/R & RECORDS TO
	—	NYK

34. RCOS OBTAINED

a. INVOICE NO. AND DATE
#4789 10-8-89

b. SHIPPING RECORD *(B/L, F/B, Waybill, Affidavit, etc.)* NO. AND DATE
F/B # 09012 10-9-89

c. OTHER DOCUMENTS *(Affidavits from dealers, etc.)* SIGNER'S NAME AND DATE
Mr. Iam Wright, Reg. Pharm., Dealer Firm, dtd. 10-15-89

35. REMARKS *(If additional space is needed, attach Form FDA 464a, C/R Continuation Sheet)*

* #21. Shipment also on hand consists of: 2/100 tablet bottles & 3/1000 tablet bottles labeled as on line #15 above, except for quantity of contents statement. All 27/500 tab. btls. examined visually and each contained approx. 80% brown tablets & approx. 20% dark red tablets. All 100 & 1000 tablet btls. examined visually contained uniform brown tablets.

36. CONSUMER COMPLAINT NO. OR RECALL NO.	37. AMT. $ 4.25				38. 704(a) SPL		39. COLLECTOR *(Typed name and signature)*
	CRED. CD.	C	V	B	YES	NO	
N/A	☐	☒	☐	☐	☐	☒	Sylvia H. Rogers Sylvia H. Rogers

COLLECTION REPORT

ANEXO 18

Modelo de ficha de trabajo del analista

FLAG

ANALYST WORKSHEET	1. PRODUCT Frozen Breaded Shrimp		2. SAMPLE NUMBER 89-12-123
3. SEALS ☒ INTACT ☐ NONE ☐ BROKEN	4. DATE REC'D 4-4-89	5. RECEIVED FROM Philip W. Owen	6. DISTRICT OR LABORATORY DEN-DO

7. DESCRIPTION OF SAMPLE
Two cardboard cartons each sealed "89-12-123 4-3-89 James P. Landry" and identified "89-12-123 4-3-89 JPL". Case #1 contains 23 plastic bottles and Case #2 contains 20-10 oz packages. Each bottle and package identified with sub nos and "89-12-123 4-3-89 JPL". All subs received hard frozen. Chipped ice control indicates sample received frozen.

8. NET CONTENTS			9. LABELING	
	☐ NOT APPLICABLE	DECLARE/UNIT 10 oz		3 ORIGINAL(S) SUBMITTED
	☒ NOT DETERMINED	AMOUNT FOUND		COPIES SUBMITTED
	UNITS EXAMINED	% OF DECLARED		☐ NONE Attached to C/R

10. SUMMARY OF ANALYSIS
Container: (a) Subs 1-23: 8 oz wide mouth plastic bottle with screw-cap.
(b) Subs 24-43: 10 oz waxed paper carton.
Labeling: No labeling on bottles except inspector's identification. Package label submitted with collection report.
Code: (a) Subs 24-33 coded "XL-4-3" stamped on top of cartons.
(b) Subs 34-43 coded "XL-3-27" stamped on top of cartons.
Product: Frozen, raw peeled shrimp, coated with breading material. Raw material and in-line subs.
Analysis: Subs 1-43 examined for coliforms, E. coli, and Staphylococcus aureus MPN's and aerobic plate count.
Method: AOAC XIV, 46.013-46.016.
Results: (1) See Summary of Bacteriological Results, pages 2 and 3.
(2) APC geometric average 10 subs finished product coded "XL-4-3" 1,600,000/g. APC geometric average finished product coded "XL-3-27" 2,100,000/g. See Attachment A.
(3) Positive controls positive, and negative controls negative. See pages 13 and 14.

11. RESERVE SAMPLE Case #1 containing subs 1-23 each with approximately 200 g (Subs 3, 4, and 5 with 300 g). Case #2 containing subs 24-33 each with approximately 250 g in original cartons. Each original case sealed "89-12-123 4-5-89 Brian L. Smith".

12. a. ANALYST SIGNATURE (Broke Seal ☒)	13.	a. BY
Brian L. Smith	WORK-SHEET CHECK	C. T. Rouse
b. Alice E. Williams		b. DATE 4-14-89
c.	14. DATE REPORTED 4-14-89	

PAGE 1 OF 4 PAGES

ANEXO 19

Resumen de los resultados bacteriológicos

SUMMARY OF BACTERIOLOGICAL RESULTS — SEE BACTERIOLOGICAL DEFINITIONS — Page 2 of 14 Pages

1. PRODUCT: Frozen Breaded Shrimp
2. SAMPLE NUMBER: 89-12-123
3. MANUFACTURER: Le Blanc Shrimp Co., Grand Isle, La.
4. DATE COLLECTED: 4-3-89

SUBSAMPLE A	DESCRIPTION B	COLIFORMS MPN PER GRAM C	E COLI MPN PER GRAM D	COAGULASE POSITIVE STAPHYLOCOCCI MPN PER GRAM E	AEROBIC PLATE COUNT ORGANISMS PER GRAM F
1	Breading from previously unopened bag	15	<3	<3	8,000
2	Dry batter from previously unopened bag	7.3	<3	<3	12,000
3	Frozen, peeled shrimp from unopened bag	7.3	<3	<3	45,000
4	Frozen, peeled shrimp from 2nd unopened bag	23	3.6	3.6	60,000
5	Frozen, peeled shrimp from 3rd unopened bag	15	<3	<3	33,000
	1st In-line sampling				
6	Shrimp after thawing in ben overnight (55°F)	460	<3	<3	450,000
7	Liquid batter freshly mixed from pot (56°F) 8:18 A.M.	15	3.6	3.6	5,000
8	Breader from machine 8:22 A.M.	11	<3	<3	560
9	Shrimp from trays at table 8:25 A.M.	1,100	<3	<3	550,000
10	Shrimp after 1st batter 8:30 A.M.	460	3.6	3.6	700,000
11	Shrimp after 1st breading 8:34 A.M.	210	<3	3.6	790,000
12	Shrimp after 2nd batter 8:39 A.M.	240	7.3	7.3	850,000
13	Shrimp after 2nd breading 8:43 A.M.	240	9.3	15	600,000
14	Shrimp from packing table 8:48 A.M.	460	9.1	11	740,000
	2nd In-line sampling				
15	Shrimp from thawing bin (iced) 50°F 1:35 P.M.	1,100	<3	<3	950,000
16	Liquid batter from pot, 66°F 1:40 P.M.	>1,100	75	240	2,300,000
17	Breader from machine 1:44 P.M.	460	23	11	250,000
18	Shrimp from trays at table 1:50 P.M.	>1,100	<3	3.6	790,000
19	Shrimp after 1st batter 1:54 P.M.	>1,100	28	150	1,800,000
20	Shrimp after 1st breader 1:59 P.M.	>1,100	43	210	2,400,000
21	Shrimp after 2nd batter 2:04 P.M.	>1,100	93	93	1,900,000
22	Shrimp after 2nd breader 2:08 P.M.	>1,100	150	240	1,500,000
23	Shrimp from packing line 2:13 P.M.	>1,100	75	93	1,800,000

1 "<3" means "not found in 1/10 gm. portion"

SUMMARY OF BACTERIOLOGICAL RESULTS

SEE BACTERIOLOGICAL DEFINITIONS Page 3 of 14 Pages

1. PRODUCT: Frozen Breaded Shrimp

2. SAMPLE NUMBER: 89-12-123

3. MANUFACTURER: Le Blanc Shrimp Co., Grand Isle, La.

4. DATE COLLECTED: 4-3-89

SUBSAMPLE A	DESCRIPTION B	COLIFORMS MPN PER GRAM[1] C	E. COLI MPN PER GRAM[1] D	COAGULASE POSITIVE STAPHYLOCOCCI MPN PER GRAM[1] E	AEROBIC PLATE COUNT ORGANISMS PER GRAM F
24	(CODE XL-4-3) Finished breaded shrimp, produced 4-3-89	>1,100	150	240	1,200,000
25		>1,100	75	93	1,400,000
26		>1,100	93	210	1,800,000
27		>1,100	240	1,100	2,600,000
28		>1,100	43	240	1,100,000
29		>1,100	460	>1,100	3,700,000
30		>1,100	23	93	950,000
31		>1,100	93	75	900,000
32		>1,100	150	460	2,100,000
33		>1,100	75	210	1,600,000
34	(CODE XL-3-27) Finished breaded shrimp, produced 3-27-89	>1,100	210	>1,100	3,600,000
35		>1,100	150	1,100	2,900,000
36		>1,100	93	460	2,700,000
37		>1,100	43	93	1,400,000
38		>1,100	75	75	1,300,000
39		>1,100	93	1,100	2,700,000
40		460	15	75	1,200,000
41		>1,100	43	210	2,800,000
42		>1,100	28	240	1,800,000
43		>1,100	75	460	1,800,000

Brian L. Smith 102

[1] "<3" means "not found in 1/10 gm. portion"

ANEXO 20

Registro bacteriológico

PRODUCT: Frozen breaded shrimp

PAGE 4 OF 14 PAGES

SAMPLE NUMBER: 89-12-123

ANALYST (S)		BLS		BLS 4/4	AEW						AEW			AEW			AEW			AEW			AEW			AEW			BLS	BLS			BLS			BLS			BLS		
4/4		4/6			COLIFORM GROUP 4/6			4/7-8			4/7-8			4/9-10			ESCHERICHIA COLI 4/10-14									4/7-10			4/9-10	4/4	COAGULASE-POSITIVE STAPHYLOCOCCI 4/6			4/8			4/10			4/9		
SUB NO	DILUTION	APC COLONIES PER PLATE		DILUTION	LST A	LST B	LST C	BG A	BG B	BG C	EC A	EC B	EC C	EMB A	EMB B	EMB C	I M V C A	I M V C B	I M V C C	LST A	LST B	LST C	GRAM STAIN A	GRAM STAIN B	GRAM STAIN C	DILUTION	BROTH A	BROTH B	BROTH C	AGAR A	AGAR B	AGAR C	STAIN A	STAIN B	STAIN C	COAG A	COAG B	COAG C
1	-2	79	81	-1	+	+	+	+	+	-	-	-	-													-1	+	-	-	+	-	-	+			-		
	-3			-2	-	(+)	-		(+)			-														-2	-	-	-									
	-4			-3	-	-	-																			-3	-	-	-									
	APC/g: 8,000			MPN/g: 15							MPN/g: < 3															MPN/g: < 3												
2	-2	129	110	-1	+	+	+	(+)	-	-	-	-	-													-1	+	-	+	-	-	-						
	-3			-2	+	+	-	+	-																	-2	-	-	-	-	-	-						
	-4			-3	-	-	-																			-3	-	-	-									
	APC/g: 12,000			MPN/g: 7.3							MPN/g: < 3															MPN/g: < 3												
3	-3	42	48	-1	+	+	+	+	-	-	-	-	-													-1	+	+	-									
	-4			-2	+	+	+	(+)	-	-	-	-	-													-2	+	-	-									
	-5			-3	+	-	-	-			-															-3	-	-	-									
	APC/g: 45,000			MPN/g: 7.3							MPN/g: < 3															MPN/g: < 3												
4	-3	59	61	-1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+				-	+	-	-			+			-	+	+	+	-	-	+			4'
	-4			-2	(+)	(+)	-	-	-		-	-														-2	+	-	-	-	-	-						
	-5			-3																						-3	-	-	-									
	APC/g: 60,000			MPN/g: 23							MPN/g: 3.6															MPN/g: 3.6												
5	-3	31	35	-1	+	+	+	+	+	-	-	-	-													-1	+	+	+	+	+	+	-	-	+			
	-4			-2	+	+	+	-	(+)	-	-	-	-													-2	-	-	-	-	-	-						
	-5			-3	-	-	-																			-3	-	-	-									
	APC/g: 33,000			MPN/g: 15							MPN/g: < 3															MPN/g: < 3												

(+) = positive at 48 hrs

BACTERIOLOGICAL RECORD

ANALYST (S):

PRODUCT: Frozen breaded shrimp

SAMPLE NUMBER: 89-12-123

PAGE 13 OF 14 PAGES

SUB NO.	DILUTION	APC COLONIES PER PLATE		DILUTION	COLIFORM GROUP LST A	LST B	LST C	BG A	BG B	BG C	ESCHERICHIA COLI EC A	EC B	EC C	EMB A	EMB B	EMB C	I M V C A	I M V C B	I M V C C	LST A	LST B	LST C	GRAM STAIN A	GRAM STAIN B	GRAM STAIN C	DILUTION	COAGULASE-POSITIVE STAPHYLOCOCCI BROTH A	BROTH B	BROTH C	AGAR A	AGAR B	AGAR C	STAIN A	STAIN B	STAIN C	COAG A	COAG B	COAG C
Positive media control	-	E. coli		-	+			+			+			+			+	+	-	+			-			-											
	-	E. aerogenes		-	+			+			+			+			-	-	+	+			-			-											
	-	S. aureus		-																						-	+			+			+			(+)	
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	APC/gr			MPN/gr							MPN/gr															MPN/gr											
Pipette	-	0	0	-																						-											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	APC/gr			MPN/gr							MPN/gr															MPN/gr											
Plate count agar and Petri dish	-	0	0	-																						-											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	APC/gr			MPN/gr							MPN/gr															MPN/gr											
Diluents (90 and 450 ml)	- 90	0	0	-																						-											
	- 450	0	0	-																						-											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	APC/gr	90 ml - 0 450 ml - 0		MPN/gr							MPN/gr															MPN/gr											
Blender	-	0	0	-																						-											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	APC/gr	0		MPN/gr							MPN/gr															MPN/gr											

BACTERIOLOGICAL RECORD

ANALYST (S)

SUB NO.	DILUTION	APC COLONIES PER PLATE		DILUTION	COLIFORM GROUP LST A	LST B	LST C	BG A	BG B	BG C	ESCHERICHIA COLI EC A	EC B	EC C	EMB A	EMB B	EMB C	I M V C A	I M V C B	I M V C C	LST A	LST B	LST C	GRAM STAIN A	GRAM STAIN B	GRAM STAIN C	DILUTION	COAGULASE-POSITIVE STAPHYLOCOCCI BROTH A	BROTH B	BROTH C	AGAR A	AGAR B	AGAR C	STAIN A	STAIN B	STAIN C	COAG A	COAG B	COAG C
Negative media control	-	0	0	-	-			-			-			-			-	-	-	-			-			-	-			-								
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	APC/gi			MPN/gi							MPN/gi															MPN/gi											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	APC/gi			MPN/gi							MPN/gi															MPN/gi											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	APC/gi			MPN/gi							MPN/gi															MPN/gi											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	APC/gi			MPN/gi							MPN/gi															MPN/gi											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	-			-																						-											
	APC/gi			MPN/gi							MPN/gi															MPN/gi											

PRODUCT: Frozen breaded shrimp

PAGE 14 OF 14 PAGES

SAMPLE NUMBER: 89-12-123

BACTERIOLOGICAL RECORD

ANEXO 21

Registro de Salmonella

PRODUCT: Active Dry Yeast — PAGE 2 OF 4 PAGES — SAMPLE NUMBER: 89-01-345

MANUFACTURER (Name and Address):

	SUB NO.	1	2	3	4	5
SUMMARY	SPECIES OR GROUP FOUND	Salmonella E4				
	OTHER TESTS					

Section	Test	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
LYSINE IRON (88 16-17)	GAS	-																													
	H_2S	-																													
	BUTT	K																													
	SLANT	K																													
H ANTIGENS (HQ1 5/28) SPICER-EDWARDS	1																														
	L																														
	en																														
	4																														
	3																														
	2																														
	1																														
	POLY	+																													
O ANTIGENS (HQ1 5/28)	FACTORS																														
	GROUP	E4																													
	POLY	+																													
	LYSINE DEC	K																													
88 25-28	MALONATE	-																													
	SUCROSE	-																													
	DULCITOL	AG																													
	LACTOSE	-																													
88 28	KCN	-																													
88 27-31	C	+																													
	V	-																													
	M	+																													
	I	-																													
88 27-28	UREA	-						+								+								+							
TSI[1] (88 26-27)	GAS	+	+	+	+	+	+	+					+			+								+							
	H_2S	+	+	+	+	+	+	+					+			+								+							
	BUTT	A	A	A	A	A	A	A					A			A								A							
	SLANT	K	K	K	K	K	K	K					A			K								K							
SELECTIVE AGARS (88 5/25-26)		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
		BS	HE	XLD	BS	HE	XLD	BS	HE	XLD	BS	HE	XLD	BS	HE	XLD	BS	HE	XLD	BS	HE	XLD	BS	HE	XLD	BS	HE	XLD	BS	HE	XLD
ANALYST(S)	ENRICHMENT (88 5/24)	LST			TT			LST			TT			LST			TT			LST			TT			LST			TT		
	PRE-ENRICHMENT (88 5/23)	TS						TS						TS						TS						TS					
	SUB NO.	1						2						3						4						5					

[1] A - Acid, AG - Acid and Gas, K - Alkaline.

SALMONELLA RECORD

ANEXO 22

Registro de Shigella

SHIGELLA RECORD	PRODUCT: Cole Slaw Salad	I NUMBER	SAMPLE NUMBER: 89-23-169
DISTRICT OR DIVISION: CIN-DO	ANALYST: Nancy Ellen Cook	DATE: 3/20/89	PAGE 2 OF 4 PAGES

1. ENRICHMENT	3/20 GN (A)												SELENITE-CYSTINE (B)																
2. TIME	24 HOURS (C)						48 HOURS (D)						24 HOURS (E)						48 HOURS (F)										
3. SELECTIVE AGARS 3/21-22	XLD (O)		DC (P)		EMB (Q)		XLD (R)		DC (S)		EMB (T)		XLD (U)		DC (V)		EMB (W)		XLD (X)		DC (Y)		EMB (Z)						
4. COLONY	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2					
5. TSI SLANT	K		A		K								K		A		K		K										
TSI BUTT	A		A		A								A		A		A		A										
TSI GAS 3/22-23	–		+		–								–		+		–		–										
TSI H_2S	–		+		–								–		+		–		–										
6. SCREENING TESTS UREASE	–		+		–								–		–		–		–										
SCREENING TESTS MOTILITY 3/23	–		+		–								–		+		–		–										
SCREENING TESTS MORPHOLOGY 3/23	+		+		+								+		+		+		+										
SCREENING TESTS KCN	–		+		–								–		+		+		–										
SCREENING TESTS MALONATE	–		–		–								–		–		–		–										
7. TESTS i	–		+		+								–		–		+		+										
TESTS u	+		+		+								+		+		+		+										
TESTS v 3/23	–		–		–								–		–		–		–										
TESTS c	–		–		–								–		+		+		–										
SHIGELLA EXCLUSION 8. NEG ACID LACTOSE	–		–		–								–		AG		–		–										
SHIGELLA EXCLUSION NEG ACID SUCROSE	–		AG		–								–		–		A		–										
SHIGELLA EXCLUSION NEG ACID SALICIN 3/24	–		–		–								–		–		–		–										
SHIGELLA EXCLUSION NEG ACID INOSITOL 3/24	–		–		–								–		–		A		–										
SHIGELLA EXCLUSION NEG ACID ADONITOL	–		–		–								–		–		–		–										
SHIGELLA EXCLUSION 9. NEG GAS GLUCOSE	A		AG		A								A		AG		A		A										
SHIGELLA EXCLUSION NEG GAS MALTOSE	A		AG		–								–		AG		–		A										
SHIGELLA EXCLUSION NEG GAS ARABINOSE	A		–		–								A		AG		–		A										
SHIGELLA EXCLUSION NEG GAS XYLOSE	–		AG		–								–		AG		–		A										
SHIGELLA EXCLUSION NEG GAS MANNITOL	A		–		A								A		AG		–		A										
10. SEROLOGY UNBOILED / BOILED 3/27 A																	A, +												
SEROLOGY B					+																								
SEROLOGY C													C_1 +																
SEROLOGY D	+																												
SEROLOGY AD																			+										
11. PRESUMPTIVE IDENTIFICATION GENERA/GROUP 3/27	Shigella Group D				Shigella Group B								Shigella Group C_1																
SCHEMA LOCATION OF ISOLATES 12. POSITIVE SHIGELLA ISOLATE	S. sonnei				S. flexneri								S. boydii																
SCHEMA LOCATION OF ISOLATES 13. NEGATIVE ISOLATE (Leaker)			Proteus												Citrobacter		Providencia stuartii		Alkalescens=Dispar										
14. ADDITIONAL TESTS 3/24 Dulcitol	–		–		–								–		AG		–		–										
ADDITIONAL TESTS Sorbitol	–		–		–								A		AG		–		–										
ADDITIONAL TESTS Rhamnose	A		AG		–								–		AG		–		–										
ADDITIONAL TESTS Raffinose	–		–		–								–		–		–		–										

ANEXO 23

Hoja complementaria para los alimentos enlatados

PRODUCT: Canned Stewed Tomatoes

ANALYSTS: Leslie S. Paige

PAGE 3 OF 7 PAGES

SAMPLE NUMBER: 89-35-321

SUBSAMPLE NUMBER			1		2		3		4		5		6		
CODE			W1/G0/TW		→		→		→		→		→		
CONTAINER CONDITION	C/H DESCRIPTION		Normal		→		→		→		→		→		
	BEFORE INCUBATION		Normal		→		→		→		→		→		
	AFTER INCUBATION		Normal		Springer		Normal		→		→		→		
	NO. DAYS INCUBATED		14		→		→		→		→		→		
	INTERNAL		Normal		Dark discoloration around can seam		Normal		→		→		→		
	SEAM EXAMINATION		Normal		Leakage along seam		Normal		→		→		→		
	MICRO-LEAK		None		Several pin holes along seam		None		→		→		→		
PRODUCT	pH		4.4		4.9		4.5		4.4		4.3		4.4		
	ODOR AND APPEARANCE		Normal		Dark discoloration, sour smell		Normal		→		→		→		
	SMEAR		3-7 rods and 1-3 cocci/field		2-4 rods and 1-6 cocci/field		2-5 rods and 3-4 cocci/field		1-5 rods and 2-3 cocci/field		1-4 rods and 6-13 cocci/field		9-15 rods and 5-7 cocci/field		
GAS			No H_2 or CO_2		H_2 and CO_2		No H_2 / slight CO_2		No H_2 or CO_2		No H_2 or CO_2		No H_2 / slight CO_2		
CULTURE TESTS	COOKED LIVER (Cooked meat)	35°C	ND	ND	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	
		55°C	ND	ND	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	
	BROM-CRESOL PURPLE BROTH	35°C	ND	ND	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	
		55°C	ND	ND	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	
	ACID BROTH	30°C	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	
		55°C	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	
	MALT EXTRACT	30°C	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
MICROSCOPIC EXAMINATION			No microorganisms observed		Acid broth, 30°C - both tubes with bacilli		No microorganisms observed		→		→		→		
					55°C - both tubes with cocci										
SUMMARY			Normal can and product		Can with decomposing product and microleaks around can seam closure		Normal can and product		→		→		→		

CANNED FOOD CONTINUATION SHEET

ANEXO 24

Hoja complementaria para el botulismo

PRODUCT: Smoked Salmon | PAGE 2 OF 5 PAGES | SAMPLE NUMBER: 89-11-110

METHOD OF PREPARATION

200 gms fish + 200 ml sterile gel phosphate buffer + approx. 10 gms sterile sand ground in a sterile mortar with a sterile pestle. Mixture centrifuged and filtered through Millipore filter. Filtrate adjusted to pH 6.1. Half of the filtrate used for toxicity screening test; remainder stored at 0°C for confirmation test.

A sub = filtrate heated 10 min at 100°C (undiluted)
B sub = filtrate non-trypsinized
C sub = filtrate trypsinized. All injections 0.5 ml intraperitoneally.

ANALYST(S): Edward H. Lasinski | DATE: 5/3/89

SUB NO.	TOXICITY SCREENING TEST	NEUTRALIZATION: UNPROTECTED	NEUTRALIZATION: PROTECTED			SUMMARY
1A	0					
1B	0 -1 -2 0 0 0					
1C	0 -1 -2 0 0 0					
2A	0					
2B	0 -1 -2 2 1 1					
2C	0 -1 -2 2 2 2	2 2 2	Protected A 2 2 2	Protected B 2 2 2	Protected E 0 0 0	Mice protected by E antitoxin; not by A or B
3A	0 -1 -2 0 2 0	0 0 0	0 1 0	0 0 0	0 0 0	See page 5 for repeat analysis on filtrate. No toxicity.
3B	0					
3C	0 -1 -2 0 0 0					
4A	0					

* NUMBER OF DEAD MICE OUT OF 2 INOCULATED

BOTULISM CONTINUATION SHEET

Registro bacteriológico de mariscos

ANEXO 25

LES ANALYSIS 5/1	5/3 PAG		5/1 LES	LES										PAG					PAG					PAG					PAG					PAG					PAG					PAG					LES				
SUB NO.	DILUTION	5/3 APC COLONIES PER PLATE		DILUTION	COLIFORM GROUP 5/2-3 LST					COLIFORM GROUP 5/3-5 BG					5/3-5 EC					5/6 EMB					5/7-10 ESCHERICHIA COLI I M V C A					I M V C B					I M V C C					I M V C D					I M V C E					5/7 LST					5/7 GRAM STAIN				
					A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A					B					C					D					E					A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
1	-1			-0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																					
	-2			-1	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	-3	32	36	-2	+	+	+	(+)	+	+	+	-	-	-	+	(+)				+	+				+	+	-	-	-	+	-	-																+	+				-	-			
	-4	5	3	-3	+	+	+	+	-	-	-	-	-																																												
	-			-																																																					
	APC/g: 34,000			MPN/100g: 4,900											MPN/100g: 4,900																																										
2	-1			-0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	-2			-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+			+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+			-	-	-					
	-3	329	325	-2	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+					+					-	+	-	-																					+					-	-			
	-4	22	25	-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																											
	-			-																																																				
	APC/g: 330,000			MPN/100g: 2,200											MPN/100g: 1,100																																										
3	-1			-0	-	-	-	-	-																																															
	-2			-1	-	-	(+)	(+)	-			-	+				+						+																-	+	-	-								+				-	
	-3	138	162	-2	-	-	-	-																																																
	-4	42	30	-3	-	-	-	-																																																
	-			-																																																				
	APC/g: 150,000			MPN/100g: 18											MPN/100g: 18																																										
4	-1			-0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+																																					
	-2			-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	-3	SPREADERS		-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	-4			-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	(+)					+	+	+					+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-									+	+	+			-	-	-
	-			-																																																				
	APC/g:			MPN/100g: 160,000											MPN/100g: 92,000																																										
5	-1			-0	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-																																										
	-2	204	196	-1	+	+	+	+	+	-	-	(+)	-	-			+						+														+	+	-	-											+				-	
	-3	12	14	-2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-																																										
	-4	0	0	-3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-																																										
	-			-																																																				
	APC/g: 20,000			MPN/100g: 18											MPN/100g: 18																																										

PRODUCT: Shucked Oysters

PAGE 3 OF 6 PAGES

SAMPLE NUMBER: 89-13-252

SHELLFISH BACTERIOLOGICAL RECORD

ANEXO 26

Lista de cuestiones para la comprobación de la garantía de calidad

A. Medio ambiente

1. Las cañerías, la calefacción, el alumbrado, la ventilación, etc. se comprueban regularmente y el personal del laboratorio verifica su funcionamiento con criterios cualitativos para asegurarse que está en buenas condiciones para la labor que se está realizando.

( ) Si ( ) No

2. El cuidado de los locales es satisfactorio: se evitan los hacinamientos, se facilita el acceso, se vigilan los factores de seguridad y de limpieza regularmente. Hay un responsable de estas condiciones, en ausencia de los principales usuarios de la habitación.

( ) Si ( ) No

3. Los bancos están desembarazados para la realización de los análisis.

( ) Si ( ) No

4. Las aberturas de ventilación no se utilizan para almacenar productos químicos o reactivos durante períodos prolongados.

( ) Si ( ) No

5. Las puertas corredizas de vidrio de los armarios donde se guardan los instrumentos de vidrio o los soportes están siempre cerradas.

( ) Si ( ) No

6. La calidad microbiológica del aire se determina cada dos semanas, registrándose los resultados. Esto puede llevarse a cabo exponiendo al aire una placa abierta de agar durante 15 minutos. El número de colonias después de la incubación no debería exceder de 15. Cuando el número excede de 15, se suspenden los trabajos del laboratorio y se desinfectan los locales.

( ) Si ( ) No

7. No se utlizan ventiladores.

( ) Si ( ) No

8. Los bancos se frotan con desinfectantes no inflamables antes y después de los análisis de muestras.

( ) Si ( ) No

9. El sistema de eliminación de materias patógenas es adecuado.

( ) Si ( ) No

10. Se toman medidas para prevenir, eliminar o reducir la infestación de insectos y roedores, etc.

( ) Si ( ) No

11. Cuando el laboratorio recurre a los servicios de una empresa comercial de plaguicidas, se lleva un registro escrito con las fechas de los rociados de plaguicidas.

( ) Si () No

12. Hay normas sobre la integridad de las muestras y las condiciones ambientales, en relación con el consumo de tabaco, comida, y bebidas en el laboratorio. Está prohibido fumar, comer y beber en los bancos de trabajo, o donde pudiera interferir en el trabajo.

( ) Si ( ) No

13. Las deficiencias ambientales ajenas a la voluntad del personal del laboratorio se ponen enseguida en conocimiento de la administración.

( ) Si ( ) No

B. Muestreo

1. Antes de analizar una muestra, el analista determina si se ha seguido un plan adecuado de recolección.

( ) Si ( ) No

2. Si la recolección de la muestra no ha sido válida, se notifica al recolector y se le pide que recoja una muestra válida.

( ) Si ( ) No

3. Hay un sistema de registro de responsabilidad de las muestras.

( ) Si ( ) No

4. Hay un sistema de registro de responsabilidad de los cultivos de referencia.

( ) Si ( ) No

5. Si la muestra se compone de varias unidades, cada unidad lleva su etiqueta para conservar su integridad individual durante el análisis.

( ) Si ( ) No

6. Si la muestra se compone de varias unidades, cada unidad debe analizarse individualmente salvo que se indique otra cosa.

( ) Si ( ) No

7. El analista verifica que cada muestra vaya acompañada de un informe de recolección que contenga la siguiente información: tipo de alimento de la muestra, número de la muestra, fecha de recolección, nombre o número de identificación del recolector, motivo de la recolección, nombre y dirección del fabricante, código del fabricante, tamaño del lote muestreado, descripción de la muestra, método de recolección y destino de la muestra.

( ) Si ( ) No

8. Si las muestras se recogen con la técnica aséptica, los controles adecuados (recipiente estéril, guantes estériles y utensilios de recolección estériles) van incluidos con la muestra.

( ) Si ( ) No

9. El analista determina que la integridad microbiológica de la muestra no se ha alterado durante el transporte, tomando la temperatura del termómetro de mayor graduación.

( ) Si ( ) No

10. Si la muestra no puede analizarse inmediatamente a la llegada al laboratorio, el analista procura que se almacene en condiciones adecuadas para mantener su integridad biológica.

( ) Si ( ) No

11. Antes del análisis, el analista examina el estado físico de los recipientes de las muestras para verificar si hay desgarrones, agujeros, etc.

( ) Si ( ) No

C. Equipo

1. Generalidades

a. Todas las piezas del equipo están situadas en un entorno adecuado que garantiza su buen funcionamiento.

( ) Si ( ) No

b. Todas las piezas del equipo se usan adecuadamente de conformidad con las instrucciones del fabricante.

( ) Si ( ) No

c. Los instrumentos se calibran/normalizan antes de su uso, y durante su uso según sea menester.

( ) Si ( ) No

d. Los manuales relativos al instrumental y el equipo se guardan en lugares de fácil acceso para el personal del laboratorio.

( ) Si ( ) No

e. El laboratorio dispone de un programa de mantenimiento preventivo del instrumental y el equipo, que pueda correr a cargo del personal del laboratorio. Toda irregularidad en el funcionamiento del equipo se comunica de inmediato al supervisor.

( ) Si ( ) No

f. Todo el equipo que no se utiliza regularmente o no funciona bien se rotula de inmediato.

( ) Si ( ) No

g. Se lleva un registro escrito del mantenimiento del equipo del laboratorio.

( ) Si ( ) No

h. Se conocen los nombres de los principales usuarios del instrumental y el equipo delicados.

( ) Si ( ) No

i. El personal está familiarizado con los procedimientos para hacer reparar el instrumental/equipo.

( ) Si ( ) No

2. Específico

a. Incubadoras

1. El interior está limpio, y carente de filtraciones.

( ) Si ( ) No

2. La temperatura interna se vigila mediante uno o varios termómetros calibrados de inmersión parcial, cuyo número depende del tamaño de la incubadora. Estos termómetros se anotan en el registro de temperaturas.

( ) Si ( ) No

3. La incubadora de aire se mantiene a 35° con una tolerancia de 2°.

( ) Si ( ) No

4. Los termómetros de inmersión parcial se calibran anualmente, y se lleva un registro de las calibraciones.

( ) Si ( ) No

5. Los intervalos de graduación de los termómetros de inmersión parcial no exceden de 0,1°.

( ) Si ( ) No

6. Las columnas de mercurio liquido de los termómetros de inmersión parcial se inspeccionan todos los días para determinar las interrupciones de la columna.

( ) Si ( ) No

7. Las hojas de registro de temperatura se firman y fechan al ponerse y al quitarse.

( ) Si ( ) No

8. Las hojas de registro de temperatura se cambian antes de que se produzcan impresiones superpuestas.

( ) Si ( ) No

9. Las hojas de registro de temperatura se guardan en un archivo propio durante 3 años.

( ) Si ( ) No

10. El nivel de humedad de la incubadora se determina indirectamente cada 3 meses calculando el porcentaje de pérdida de peso de las placas de agar incubadas a 35° durante 48 $\pm$ 2 horas, y esta información se anota en el registro de temperatura.

( ) Si ( ) No

11. El porcentaje de pérdida de peso de las placas de agar incubadas a 35° durante 48 $\pm$ 2 horas no excede del 15 por ciento.

( ) Si ( ) No

b. Baños maría

1. Los baños están limpios y no presentan señales de oxidaciones.

( ) Si ( ) No

2. La tapa está bien ajustada.

( ) Si ( ) No

3. La temperatura del baño maría se vigila mediante un termómetro calibrado de inmersión total. Las temperaturas se toman al comienzo y al final de la jornada de trabajo, y 3 ó 4 veces en el transcurso de ésta. Los resultados se anotan en el registro de temperatura.

( ) Si ( ) No

4. Los termómetros de inmersión total se calibran todos los años, y se lleva un registro de las calibraciones.

( ) Si ( ) No

5. Los instrumentos de graduación de los termómetros de inmersión total no exceden de 0,1°.

( ) Si ( ) No

6. Las columnas de mercurio líquido de los temómetros de inmersión total se inspeccionan diariamente, para determinar las interrupciones de la columna.

( ) Si ( ) No

7. Las hojas de registro de temperaturas se firman y fechan al ponerse y al quitarse.

( ) Si ( ) No

8. Las hojas de registro de temperaturas se cambian antes de que se superpongan las impresiones.

( ) Si ( ) No

9. Las hojas de registro de temperaturas se guardan en un archivo propio durante 3 años.

( ) Si ( ) No

10. Cuando no se emplea un termógrafo, se recurre a cultivos de Escherichia coli y de Enterobacter aerogenes para verificar que la temperatura no ha excedido de los límites de tolerancia durante las horas no laborales.

( ) Si ( ) No

c. Refrigeradores y congeladores

1. El interior está limpio y carece de filtraciones.

( ) Si ( ) No

2. Las temperaturas internas del refrigerador (4°) y el congelador (-20°) se vigilan mediante uno o varios termómetros calibrados de inmersión parcial. Las temperaturas tomadas diariamente se anotan en un libro de registro.

( ) Si ( ) No

3. Los termómetros de inmersión parcial se calibran todos los años, y se lleva un registro de las calibraciones.

( ) Si ( ) No

4. Los intervalos de graduación de los termómetros de inmersión parcial no exceden de 1°.

( ) Si ( ) No

5. Las columnas de mercurio líquido de los temómetros de inmersión parcial se inspeccionan diariamente para determinar las interrupciones de la columna.

( ) Si ( ) No

d. Autoclaves

1. El autoclave puede mantener una temperatura interna de 121° bajo una presión de 15 psi.

( ) Si ( ) No

2. Un ciclo completo no lleva más de 45 minutos.

( ) Si ( ) No

3. El autoclave lleva manómetros de la presión y la temperatura en la parte de la evacuación, y una válvula de seguridad en estado de funcionamiento.

( ) Si ( ) No

4. El autoclave está equipado con un termógrafo para disponer de un registro permanente de ciclo de esterilización.

( ) Si ( ) No

5. Las hojas de registro de la temperatura del autoclave se guardan por lo menos durante tres años.

( ) Si ( ) No

6. Durante la despresurización no se producen burbujas de aire en las ampollas de fermentación.

( ) Si ( ) No

7. Con cada carga se usa un indicador microbiológico, como una ampolla de esporas de Bacillus stearothermophilus, un termómetro de registro máximo o una cinta indicadora de esterilidad.

( ) Si ( ) No

8. Para cada carga se lleva un registro cronológico y de la temperatura.

( ) Si ( ) No

9. El autoclave es objeto de un servicio de mantenimiento todos los años, y se lleva el correspondiente registro.

( ) Si ( ) No

e. Hornos de aire caliente

1. El horno está equipado con un termómetro calibrado capaz de registrar temperaturas de 160-180°.

( ) Si ( ) No

2. El termómetro se calibra anualmente, y se lleva un registro de las calibraciones.

( ) Si ( ) No

3. El intervalo de graduación de este termómetro no excede de 1°.

( ) Si ( ) No

4. Para cada ciclo de esterilización se lleva un registro cronológico y de la temperatura.

( ) Si ( ) No

5. Para cada carga se utiliza una cinta indicadora de esterilidad de tipo comercial.

( ) Si ( ) No

f. Balanzas

1. Los platillos de las balanzas están limpios.

( ) Si ( ) No

2. Todas las balanzas de alta precisión se limpian y calibran anualmente.

( ) Si ( ) No

3. Los registros de las calibraciones anuales se guardan en libros encuadernados o en archivos.

( ) Si ( ) No

g. Medidores de pH

1. El estuche del medidor de pH está limpio y desempolvado.

( ) Si ( ) No

2. Cuando no se utilizan, los electrodos de cristal se guardan en una solución reguladora de pH 7.

( ) Si ( ) No

3. Cuando no se utilizan, los electrodos de referencia se guardan en una solución de 0,1 M KCl.

( ) Si ( ) No

4. Los medidores de pH se normalizan antes de cada uso.

( ) Si ( ) No

5. Sólo se utilizan estándares reguladores de pH válidos para el uso.

( ) Si ( ) No

6. Las alícuotas de los estándares reguladores de pH no se vuelven a utilizar.

( ) Si ( ) No

h. Mezcladores

1. La base del mezclador está limpia.

( ) Si ( ) No

2. La velocidad de rotación del mezclador se ha calibrado con un tacómetro, y se ha registrado el dato correspondiente.

( ) Si ( ) No

i. Campana de flujo laminar

1. Todos los procedimientos que atañen a organismos patógenos, introducción de medios estériles o análisis de alimentos enlatados para determinar la esterilidad, se aplican bajo una campana laminar.

( ) Si ( ) No

2. El interior de la campana se limpia con un trapo empapado en líquido desinfectante antes y después de cada utilización.

( ) Si ( ) No

3. Dentro de la campana se emplean mechas Bunsen, Fisher o cualquier otra mecha de laboratorio.

( ) Si ( ) No

4. El funcionamiento de la campana se verifica mensualmente exponiendo placas de agar de sangre a la corrriente de aire durante 1 hora. Después de una incubación a 35° durante 24 a 48 horas no se observan colonias en las placas. Los resultados se registran.

( ) Si ( ) No

5. Todos los años un técnico especializado realiza un servicio de mantenimiento de la campana, y los resultados se anotan en un libro de registro.

( ) Si ( ) No

j. Microscopios

1. Los microscopios no se cambian de sitio.

( ) Si ( ) No

2. Mientras no se utilizan, los microscopios están protegidos contra el polvo con una funda.

( ) Si ( ) No

3. El soporte del microscopio está limpio.

( ) Si ( ) No

4. Los objetivos del microscopio están limpios.

( ) Si ( ) No

5. Todos los años se efectúa un servicio de mantenimiento de los microscopios, y se lleva un registro.

( ) Si ( ) No

k. Instrumental de vidrio

1. El instrumental de vidrio del laboratorio está hecho de cristal de borosilicato.

( ) Si ( ) No

2. Los instrumentos de vidrio no presentan grietas ni melladuras.

( ) Si ( ) No

3. Las puntas de los cuentagotas no están melladas.

( ) Si ( ) No

4. Las bocas de los frascos de dilución no están melladas.

( ) Si ( ) No

5. Los instrumentos de vidrio están limpios y desprovistos de residuos de soportes secos.

( ) Si ( ) No

6. Los recipientes de tapón de rosca tienen revestimientos no tóxicos, a prueba de filtraciones, que pueden soportar varios tratamientos repetidos en autoclave durante 15 minutos a 121°.

( ) Si ( ) No

7. Los instrumentos calibrados de vidrio están graduados de manera visible.

( ) Si ( ) No

D. Productos químicos, soportes y reactivos

1. Se lleva un inventario de todos los productos químicos y medios deshidratados.

( ) Si ( ) No

2. Sólo se hacen pedidos de tinturas certificadas para uso bacteriológico.

( ) Si ( ) No

3. Los frascos de los soportes y los productos químicos se fechan y rubrican al recibirse y abrirse.

( ) Si ( ) No

4. Se descartan los medios, sueros y reactivos cuya fecha de validez ha vencido.

( ) Si ( ) No

5. Los medios deshidratados no se utilizan si están aglutinados o descoloridos.

( ) Si ( ) No

6. Los medios deshidratados y los productos químicos se guardan en frascos herméticamente cerrados, protegidos contra el polvo, la humedad excesiva y la luz solar.

( ) Si ( ) No

7. En la preparación de todos los medios se emplea agua pura del laboratorio.

( ) Si ( ) No

8. Los medios deshidratados se disuelven completamente antes de su utilización.

( ) Si ( ) No

9. Se lleva un registro de la preparación de todos los medios rehidratados y reactivos químicos.

( ) Si ( ) No

10. El pH se verifica en cada serie de medios después de la preparación y el tratamiento en autoclave.

( ) Si ( )No

11. El tratamiento en autoclave de los medios se efectúa de conformidad con las recomendaciones específicas (tiempo, temperatura, presión) del procedimiento que se emplee.

( ) Si ( ) No

12. Los medios en tubos de fermentación se examinan después del tratamiento en autoclave. Los tubos de fermentación con burbujas de aire se descartan.

( ) Si ( ) No

13. Se lleva un registro de los tratamientos en autoclave para que puedan determinarse las condiciones de esterilización de cada serie de medios.

( ) Si ( ) No

E. Estándares

1. Las cepas bacteriales se verifican para comprobar su pureza y autenticidad antes de ser utilizadas. Los resultados se anotan en un libro de registro.

( ) Si ( ) No

2. Los cultivos de referencia se mantienen en condiciones a corto y a largo plazo para garantizar la viabilidad y estabilidad de las características bioquímicas, serológicas y patógenas.

( ) Si ( ) No

F. Metodología

1. Se aplica el método apropiado de análisis. Siempre que sea posible, este método ha sido validado por una organización oficial como la Association of Official Analytical Chemists, el Comité Nórdico de Análisis de los Alimentos, la Comisión Internacional para las Especificaciones Microbiológicas de los Alimentos, etc.

( ) Si ( ) No

2. Todos los métodos empleados deben aplicarse al pie de la letra.

( ) Si ( ) No

3. Si circunstancias insuperables exigen una o más modificaciones del método oficial, los cambios se anotan en la ficha de trabajo del analista.

( ) Si ( ) No

4. Si ha de utilizarse un método no oficial, el método se valida en el propio laboratorio del analista.

( ) Si ( ) No

5. En cada análisis de una muestra van incluidos los controles apropiados (véase la sección 9.2).

( ) Si ( ) No

G. Ensayos con animales

1. Los ratones se someten a cuarentena por lo menos una semana antes de ser utilizados.

( ) Si ( ) No

2. Los suelos de la habitación de los animales se barren y friegan todos los días con desinfectante.

( ) Si ( ) No

3. Las paredes de la habitación de los animales se desinfectan por lo menos una vez al mes.

( ) Si ( ) No

4. La temperatura y la humedad de la habitación de los animales se controlan con un higrotermógrafo.

( ) Si ( ) No

5. Las hojas del higrotermógrafo se cambian todas las semanas antes de que se superpongan las impresiones.

( ) Si ( ) No

6. El analista que coloca y extrae las hojas del higrotermógrafo pone sus iniciales y la fecha.

( ) Si ( ) No

7. Las hojas usadas del higrotermógrafo se guardan en el libro de registro.

( ) Si ( ) No

8. En la habitación de los animales hay un cronógrafo para alternar los períodos de 12 horas de luz y oscuridad.

( ) Si ( ) No

9. Las jaulas son suficientemente grandes para evitar el hacinamiento.

( ) Si ( ) No

10. Las jaulas llevan etiquetas u otra forma de identificación.

( ) Si ( ) No

11. Los piensos se cambian dos veces a la semana.

( ) Si ( ) No

12. El agua se cambia tres veces a la semana.

( ) Si ( ) No

13. Se lleva un registro de la frecuencia del suministro de piensos y agua a los ratones.

( ) Si ( ) No

14. Se siguen los procedimientos adecuados para sujetar e inyectar a los ratones del laboratorio (véase la sección 10.7).

( ) Si ( ) No

15. Se siguen los procedimientos adecuados para la eliminación de los ratones (véase la sección 10.8).

( ) Si ( ) No

H. Documentación

1. La información que figura en la ficha de trabajo del analista es compatible con los datos del informe de recolección.

( ) Si ( ) No

2. La ficha de trabajo describe completamente la apariencia y estado de la muestra cuando la recibió el analista.

( ) Si ( ) No

3. La ficha de trabajo refleja de forma completa y exacta la continuidad e integridad de la muestra.

( ) Si ( ) No

4. En la ficha de trabajo se indica la utilización de todos los tipos de medios y productos químicos con sus números de lote.

( ) Si ( ) No

5. En la ficha de trabajo se indica la utilización de todos los cultivos de control de referencia.

( ) Si ( ) No

6. Todos los cálculos de la ficha de trabajo son de exactitud comprobada y fáciles de entender.

( ) Si ( ) No

7. Si más de una persona participó en el análisis, en la ficha de trabajo se indica claramente quién hizo qué.

( ) Si ( ) No

8. En la ficha de trabajo se indica claramente si la muestra ha pasado a la reserva o ha sido eliminada.

( ) Si ( ) No

9. Todos los datos de la ficha de trabajo están escritos con tinta.

( ) Si ( ) No

10. Todos los errores de la ficha de trabajo están tachados con una sola línea. La anotación correcta, escrita encima, está rubricada y fechada.

( ) Si ( ) No

11. La información del registro de responsabilidad de la muestra es exacta, completa y compatible con la del registro de la recolección de la muestra y con la ficha de trabajo del analista.

( ) Si ( ) No

12. El registro de responsabilidad de la muestra da cuenta correctamente de la manipulación y el almacenamiento de la muestra.

( ) Si ( ) No

13. Los registros de recolección de la muestra están archivados correctamente.

( ) Si ( ) No

14. Las muestras están almacenadas en una habitación limpia y segura, en las condiciones adecuadas de temperatura y humedad.

( ) Si ( ) No

ISBN 92-5-303053-4

9 789253 030538

M-90 T0451S/1/6.92/1000