



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
ESPECIALIDAD EN TECNOLOGÍA E INOCUIDAD DE  
ALIMENTOS**

**TESINA:  
IMPLEMENTACIÓN DE UN PLAN DE CONTROL EN UN  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**ASESOR:  
D. C. RAÚL ÁVILA SOSA SÁNCHEZ**

**PRESENTA:  
IAL. MARÍA DEL PILAR LÓPEZ VARELA**

***DICIEMBRE 2014***

## ÍNDICE

RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
JUSTIFICACIÓN .....	7
OBJETIVO GENERAL.....	8
Objetivos particulares.....	8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	9
Parámetros intrínsecos y extrínsecos que afectan el crecimiento microbiano .....	9
pH .....	9
Contenido de humedad.....	11
Potencial óxido-reducción .....	12
Contenido de nutrientes .....	13
Parámetros extrínsecos .....	14
Temperatura .....	14
Humedad relativa del entorno .....	15
Composición de la atmósfera.....	16
Grupos microbianos indicadores en los alimentos .....	16
Microorganismos indicadores .....	17
Bacterias mesófilas aerobias (BMA) .....	18
Organismos coliformes .....	18
Coliformes fecales .....	18
Hongos.....	19
Levaduras .....	19
Vigilancia o comprobación microbiológica de los alimentos.....	20
Implantación de sistemas de calidad en laboratorio microbiológico .....	22
Sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos .....	23

DIAGRAMA DE TRABAJO.....	24
TABLA DE CONTENIDO DE MANUAL.....	26
METODOLOGÍA.....	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIÓN.....	32
BIBLIOGRAFÍA.....	34
ANEXO. MANUAL “PLAN DE CONTROL DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA”	37
1. OBJETIVO.....	2
2. ALCANCE.....	2
3. POLÍTICAS.....	2
4. RESPONSABILIDADES.....	2
5. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS.....	3
6. REFERENCIAS.....	7
7. DIAGRAMA DE PCC DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.....	8
8. PROCEDIMIENTO.....	9
8.1 TOMA DE MUESTRAS.....	9
8.2 PREPARACION DE MUESTRAS:.....	17
8.3 ESTERILIZACION.....	18
8.4 SIEMBRA DE MUESTRAS.....	19
8.5 INCUBACION.....	33
8.6 CONTEO DE COLONIAS.....	34
8.7 AREA DE TRABAJO.....	35
8.7.1 CONTROL DE PLACAS.....	36
9. ANEXOS.....	37
9.1 Plan de Autocontrol de Laboratorio de Microbiología de Alimentos.....	37
9.2 Estandarización de preparación de medios de cultivo.....	40
9.3 Información para preparación de medios de cultivo.....	42

9.4 Listado de reactivos, soluciones y consumibles .....	43
9.5 Hojas de control de equipos .....	46
9.6 Programa de calibración .....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de Aw para desarrollo de microorganismos.....	11
Tabla 2. Grupos microbianos según temperatura de desarrollo.....	15
Tabla 3. Grupos de microorganismos en los alimentos.....	16
Tabla 4. Visión de conjunto sistemática de las precauciones analíticas que son esenciales para obtener resultados fiables y reproducibles en el análisis microbiológico de las muestras de alimentos.....	17

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Intervalos de pH aproximados que permiten la multiplicación de algunos microorganismos patógenos.....	10
Figura 2. Diagrama de trabajo.....	25

## **RESUMEN**

A nivel nacional se ha producido una demanda de la solicitud de acreditación de laboratorios de análisis por diversas autoridades, tanto nacionales como internacionales para diversos campos. En otros casos se ha solicitado el cumplimiento de las Normas Oficiales Mexicanas, sin solicitar la acreditación. Por ello, se hace cada vez más necesario la implantación de un plan de control que garantice la realización de medidas satisfactorias.

La presente tesina pretende implementar un plan de control en un laboratorio de microbiología y establecer procedimientos preventivos y correctivos de los puntos de control evaluados con el fin de garantizar resultados de análisis de muestras microbiológicas confiables.

La implementación se logró empleando hojas de control, ayudas visuales, guías prácticas, capacitación de apego a procedimientos y buenas prácticas de laboratorio.

Se dio seguimiento a las verificaciones de los puntos identificando las incidencias en incumplimientos de parámetros y se establecen acciones correctivas y/o preventivas para lograr la mejora continua.

## INTRODUCCIÓN

Se han elaborado y aprobado documentos denominados Normas Oficiales, cuyo contenido aplica a productos y servicios, que con su cumplimiento se garantiza que dichos productos y servicios, son seguros y respetan el medio ambiente en cualquier país que las apliquen. Las normas suponen que se deben controlar una serie de requisitos en una empresa, proceso o un producto. Por tanto, se debe disponer de agentes que verifiquen que las empresas, productos, y procesos cumplan los requisitos de las normas aplicables (Marco, 2006).

A nivel nacional se ha producido una demanda en la solicitud de acreditación de laboratorios de análisis por diversas autoridades, tanto nacionales como internacionales para diversos campos, por ejemplo, certificadores de firma electrónica, entidades de inspección medioambiental, laboratorios de empresas. En otros casos se ha solicitado el cumplimiento de las normas, sin solicitar la acreditación. Por ello parece cada vez más necesario la implantación de un plan de control que garantice la realización de medidas satisfactorias.

Para lograr lo anterior, es necesario tener conocimiento de las normas aplicables. En 1981 se formula el sistema de Buenas Prácticas de Laboratorio con el objetivo de garantizar la calidad de la obtención de datos analíticos generados a lo largo de los estudios de valoración de riesgo de nuevas moléculas. Diseñado para evaluar la competencia de laboratorios en la realización de estudios, en general no repetitivos y que requieren toma de decisiones y juicio profesional en fases intermedias (Marco, 2006). Y en diciembre de 1999 se aprobó la Norma ISO 17025 (International Organization for Standardization) que define los requisitos de un sistema de aseguramiento de calidad para un laboratorio.

De acuerdo a Mossel (2003), la visión de conjunto sistemática de las precauciones analíticas que son esenciales para obtener resultados fiables y reproducibles en el análisis microbiológico de las muestras de alimentos depende fundamentalmente de: plan de muestreo, manipulación antes del análisis, preparación para el análisis, extracción de submuestras, preparación del macerado y de las diluciones, comprobación de los medios de cultivo, técnica de revitalización y técnica de recuento o enumeración.

El análisis microbiológico de muestras de alimentos, se requiere la mayoría de las veces con fines prácticos, es decir, como soporte o apoyo de las auditorías realizadas para comprobar el cumplimiento de los Códigos Aprobados de Prácticas de Fabricación y Distribución (CAPs). También, con alguna frecuencia, se llevan a cabo investigaciones retrospectivas, motivadas por pruebas o indicios de falta de seguridad y/o calidad microbiológica de los alimentos: contaminación con microorganismos patógenos o alteración visible. En este caso, la tarea consiste en reafirmar o rechazar el veredicto o juicio formulado inicialmente. En ambos casos, el análisis microbiológico de muestras de un producto determinado debe diseñarse de tal forma que permita la identificación y, lo que es más importante, la rectificación rápida de los fallos o deficiencias puntuales en el correcto funcionamiento de los procesos. Finalmente una adecuada observancia de las Buenas Prácticas de Laboratorio constituye la última tarea del supervisor o responsable del laboratorio (Mossel, 2003).

## **JUSTIFICACIÓN**

La necesidad de mejora de calidad de los análisis microbiológicos, además de la necesidad como profesionales de obtener resultados correctos, es demandada recientemente con insistencia por el cliente con el fin de garantizar la política de inocuidad en la elaboración de sus productos.

Los resultados de análisis microbiológicos deben ser comparables y dar resultados semejantes independientemente del laboratorio que los realice. Por esto, se realizó el esfuerzo de estandarización de las técnicas para obtención de resultados semejantes, aunque esto fue insuficiente, debido a que en los resultados de análisis microbiológico influyen más factores y no sólo el método.

De esto, surge la necesidad de la implementación de un Plan de control, que asegure la calidad de los resultados.



## **OBJETIVO GENERAL**

Implementar un plan de control en un laboratorio de microbiología de alimentos.

### **Objetivos particulares**

1. Definir los puntos de control críticos de un laboratorio de microbiología de alimentos.
2. Evaluar los puntos críticos de control mediante hojas de control.
3. Establecer procedimientos preventivos y correctivos de los puntos de control evaluados.
4. Elaborar un plan de control de los puntos críticos.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Parámetros intrínsecos y extrínsecos que afectan el crecimiento microbiano

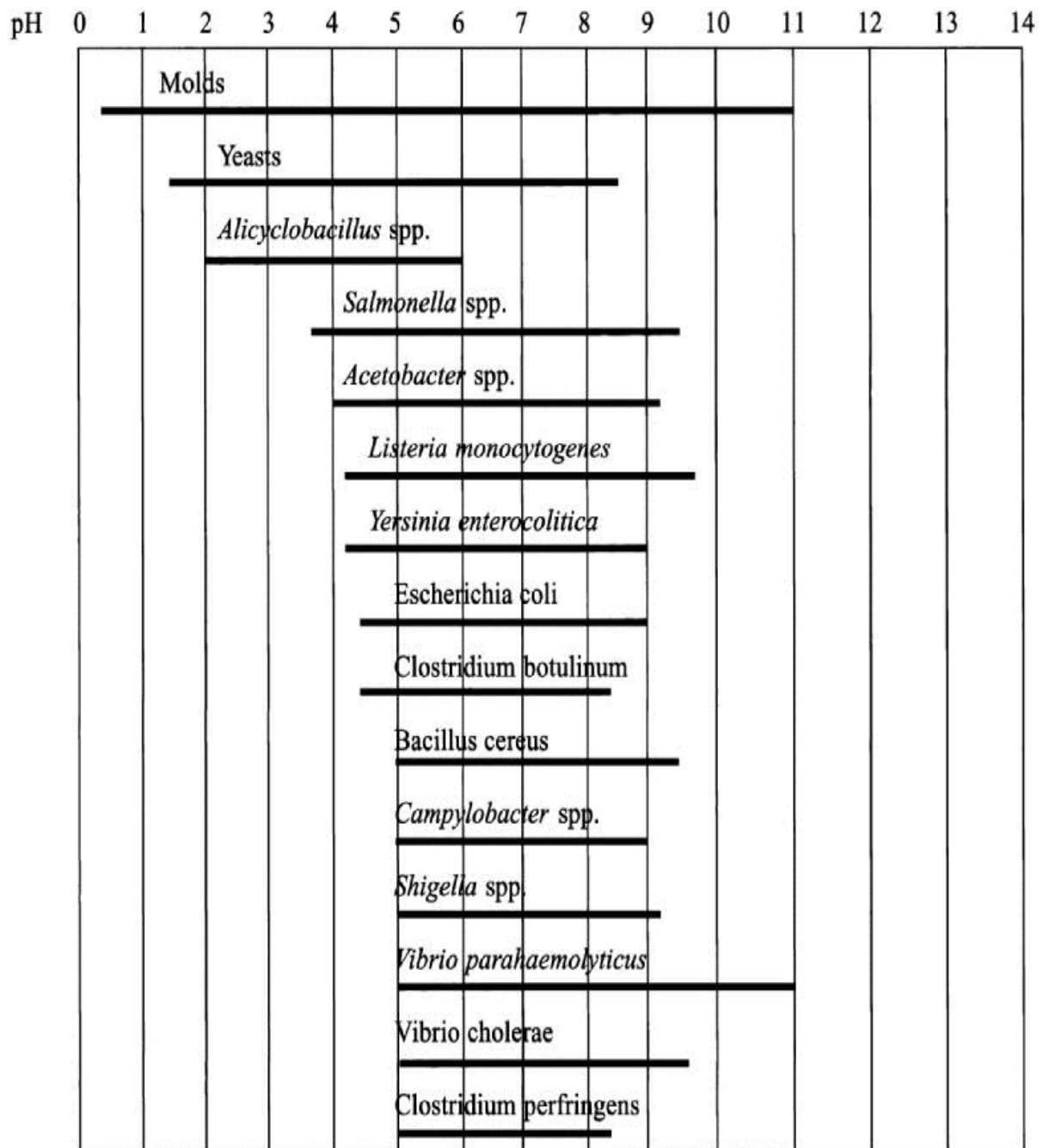
**Parámetros intrínsecos.** Éste término se refiere a ciertas características o componentes que forman parte de, o son inherentes a, los tejidos animales o vegetales.

Estos parámetros son:

1. pH.
2. Contenido de humedad.
3. Potencial de óxido reducción.
4. Contenido de nutrientes.
5. Componentes antimicrobianos.
6. Estructuras biológicas (James, 2005).

### pH

Es notorio que la mayor parte de los microorganismos crecen mejor a pH cercanos a la neutralidad (desde 6,6 hasta 7,5), aunque unos cuantos pueden desarrollarse a pH por debajo de 4,0 (Fig. 1). Las bacterias tienden a ser más exigentes que mohos y levaduras en relación con el pH al que pueden desarrollarse. Hay que decir que los pHs mínimos y máximos representados en la Figura 1 no deben considerarse como unos límites precisos y cabales, ya que es sobradamente conocido que estos límites dependen de otros factores que afectan al crecimiento microbiano (Wodzinski, 1961).



**Fig. 1** Intervalos de pH aproximados que permiten el desarrollo de algunos microorganismos patógenos.

## Efectos del pH

Los pHs adversos afectan de dos maneras, al menos, a la célula microbiana: 1) Afectan a la funcionalidad de sus enzimas, 2) al sistema de transporte de nutrientes al interior de la célula. La membrana citoplasmática de los microorganismos es relativamente impermeable a los iones  $H^+$  y  $OH^-$ . Por tanto, la concentración de tales iones en el citoplasma se mantiene razonablemente constante a pesar de las considerables variaciones que puedan darse en el pH del entorno microbiano (Rose, 1965).

## Contenido de humedad

En la actualidad está universalmente establecido que las necesidades de los microorganismos en agua deben describirse en términos de actividad de agua del entorno (Tabla 1). Este parámetro queda definido por la relación entre la presión de vapor de agua del sustrato alimenticio y la presión de vapor de agua del agua pura a la misma temperatura:  $a_w = P/P_0$ . Este concepto está relacionado con la humedad relativa con la siguiente ecuación:  $HR = 100 \times a_w$ . (Christian, 1963).

**Tabla 1.** Valores de  $a_w$  para el desarrollo de microorganismos

Microorganismo	$a_w$
<b>Bacterias</b>	0.91
<b>Levaduras</b>	0.88
<b>Mohos</b>	0.80
<b>Bacterias halófilas</b>	0.75
<b>Mohos xerófilos</b>	0.65
<b>Levaduras</b>	0.60
<b>osmófilas</b>	

*Christian, 1963*

## **Efectos de una $a_w$ baja**

El efecto general de la disminución de la  $a_w$  por debajo de la óptima es la prolongación de la fase de latencia y la disminución de la tasa específica de crecimiento y del tamaño de la población final. Cabe esperar que este efecto se deba a las acciones adversas que conlleva una disminución de la concentración de agua sobre cualquier actividad metabólica, ya que las reacciones químicas que suceden en las células necesitan un medio acuoso (Wondzinski, 1961).

Por regla general, la estrategia utilizada por los microorganismos para protegerse frente al estrés osmótico es la acumulación de solutos compatibles en el espacio intracelular. Los microorganismos halófilos logran el equilibrio osmótico manteniendo una concentración intracelular de KCl que iguala la del medio externo. A este fenómeno se le conoce como la respuesta de “sal en el citoplasma”. Los microorganismos no halófilos acumulan solutos compatibles de forma bifásica. Los tres solutos compatibles más frecuentes en la mayor parte de las bacterias son la carnitina, la glicina betaína y la prolina (Park, 1995).

## **Potencial óxido-reducción**

El potencial Redox (Eh) de un sustrato puede referirse a la facilidad con la que pierde o gana electrones. Cuando un elemento o sustancia pierde electrones, el sustrato se oxida, mientras que si el sustrato gana electrones, se reduce. Los microorganismos aerobios necesitan valores de Eh positivos (oxidados) para poder crecer, mientras que los anaerobios precisan de valores Eh negativos (reducidos) (Walden, 1975).

## **Efectos del Eh**

A los microorganismos les afecta el Eh de su entorno de la misma manera que lo hace el pH. Esto es especialmente cierto en el caso de los aerobios, que son capaces de disminuir el potencial Eh de su medio, mientras que los anaerobios no pueden hacerlo. Conforme crecen los aerobios, el oxígeno circundante se va consumiendo y, por tanto, el Eh disminuye. No obstante, el crecimiento no se frena tanto como consecuencia de la capacidad de los microorganismos de utilizar sustancias del medio donadoras de oxígeno o aceptadoras de hidrógeno. El resultado es que el medio se empobrece en sustancias oxidantes y se enriquece en reductoras. El potencial Eh de un medio puede reducirse como consecuencia del desarrollo microbiano debido a la excreción de ciertas sustancias como el H<sub>2</sub>S, que puede disminuir el Eh hasta -300mV. Al reaccionar fácilmente el H<sub>2</sub>S con el O<sub>2</sub> la primera sustancia sólo se acumula en ambientes anaerobios (Walden, 1975).

## **Contenido de nutrientes**

Los microorganismos que se desarrollan en los alimentos necesitan las siguientes sustancias para multiplicarse y desarrollar sus actividades con normalidad:

1. Agua.
2. Una fuente de energía.
3. Una fuente de nitrógeno.
4. Vitaminas y factores de crecimiento relacionados.
5. Minerales.

Los microorganismos que se desarrollan en los alimentos pueden utilizar azúcares, alcoholes y aminoácidos como fuente de energía. Algunos microorganismos tienen la

capacidad de utilizar carbohidratos complejos como almidones y celulosa, pero, en primer lugar, deben degradarlos hasta azúcares más simples. Los microorganismos también pueden utilizar grasas como fuente de energía, pero sólo pueden aprovecharse de estas sustancias un número limitado de los que crecen en los alimentos (James, 2005).

### **Parámetros extrínsecos**

Estos parámetros extrínsecos son independientes del producto en sí mismo. Se refieren a las condiciones de almacenamiento que afectan tanto al alimento como a los microorganismos que éste contenga. Los más destacados para la supervivencia de los microorganismos son:

1. La temperatura de almacenamiento.
2. La humedad relativa del entorno.
3. La presencia y concentración de gases.
4. La presencia y la actividad de otros microorganismos (James, 2005).

### **Temperatura**

Los microorganismos, tanto considerados como especies únicas o como un grupo microbiano, crecen en un intervalo de temperatura muy amplio. Por tanto resulta obvio el considerar en este momento que la temperatura permite el desarrollo de los microorganismos relevantes en los alimentos (Fernández, 1986).

Todas las reacciones biológicas fundamentales son temperatura dependientes y por ello influyen de manera decisiva en el desarrollo y la viabilidad de los microorganismos.

Los efectos de la temperatura se manifiestan en la duración de la fase lag, la tasa de desarrollo (tiempo de generación), el número o concentración finalmente alcanzado y el tiempo para ello requerido. La respuesta de la actividad microbiana a los cambios de temperatura son más inmediatos e intensos que los observados frente a otros factores. El comportamiento a diferentes temperaturas está determinado por características intrínsecas de cada microorganismo. En la Tabla 2 se presentan los límites de temperatura para el desarrollo de bacterias, las cuales se diferencian en 5 grupos (Escartin, 2000).

**Tabla 2.** Grupos microbianos según temperatura de desarrollo

Grupo	Mínimo	Óptimo	Máximo
Termófilos	40-45 °	55-75°	>75°
Termótrofos	10	42-46	~50
Mesófilos	5-15	30-45	35-47
Psicrófilos	-5-5	12-15	15-20
Psicrótrofos	-5-5	25-30	30-35

*Escartin, 2000*

### Humedad relativa del entorno

La HR del entorno donde se almacena un alimento es importante desde dos puntos de vista, la  $a_w$  del interior del alimento y el posible crecimiento de los microorganismos en la superficie del producto. Si la  $a_w$  de un alimento ha alcanzado un valor de 0,60, es de gran importancia que la HR del entorno en el que se almacena no permita que el alimento capte humedad del aire que lo rodea, incrementándose, por consiguiente, el contenido en agua de su superficie y su  $a_w$  y la de las zonas más internas hasta un grado que, quizás, ya consienta el desarrollo de los microorganismos. Existe una relación entre la HR y la temperatura, relación que deberá considerarse a la hora de determinar las condiciones de almacenamiento más adecuadas para los alimentos. Por regla general, cuanto más elevada se la temperatura, menor debe ser la HR, y viceversa (Doyle, 1997).



## Composición de la atmósfera

El comportamiento de los microorganismos y con ello, la composición microbiana de un alimento, se ve afectado por el tipo y concentración de gases en la atmósfera que le rodea. El control de la composición de la atmósfera puede emplearse por tanto, en la preservación de un alimento cuando se tiene conocimiento del tipo de microorganismos potencialmente causantes de algún tipo de deterioro y la composición de la atmósfera más propicia para retardar o inhibir su crecimiento (Escartin, 2000).

## Grupos microbianos indicadores en los alimentos

De manera general, en los alimentos existe una gran diversidad de microorganismos. Por otro lado, la composición cualitativa y cuantitativa de un alimento está determinada por numerosos factores. Excepto en productos que han recibido tratamientos antimicrobianos severos, o que por su naturaleza y estructura no suelen ser contaminados, se presenta una imagen en constante cambio. Algunos microorganismos simplemente sobreviven, otros se multiplican y otros más se inactivan. La diversidad permite agruparlos en función de la actividad o potencialidad que exhiben de manera más prominente en los alimentos. En la Tabla 3 se presenta una clasificación de los microorganismos en los alimentos (Mossel, 2003).

**Tabla 3.** Grupos de microorganismos en los alimentos

1. Indicadores
2. Deterioradores
3. Patógenos
4. Iniciadores
5. Flora indiferente

*Mossel, 2003*

## Microorganismos indicadores

Como indicadores, se utilizan no sólo microorganismos, sino productos de su metabolismo. Se califican de indicadores aquellos que sugieren o se asocian con un antecedente que compromete la calidad sanitaria de un alimento. Por ejemplo:

- a) Ponen en evidencia una exposición a la contaminación fecal o animal (coliformes fecales en bivalvos).
- b) Sugieren que se han dado facilidades para que ocurra o esté ocurriendo algún grado de actividad microbiana (bacterias mesófilas aerobias en alimentos perecederos).
- c) Constituyen evidencia de contaminación posterior a la aplicación de tratamientos térmicos (coliformes en la leche).
- d) Su concentración y los productos de su metabolismo indican falta de frescura (trimetil amina en pescado).
- e) Son indicadores de un riesgo potencial a la salud (termonucleasa en quesos en los que se favoreció el desarrollo de *S. aureus*) (Roberts, 2000).

Los grupos de microorganismos utilizados como indicadores (en su connotación amplia) de calidad en los alimentos, habitualmente no responden a criterios de agrupación taxonómica. Se definen más bien en función de ciertas características ecológicas y fisiológicas que apoyan o justifican el valor aplicativo que les intenta conferir. Entre tales aplicaciones se incluye la evidencia o posibilidad de estar asociado con:

- a. La frescura del producto.
- b. La presencia de patógenos o sus toxinas.
- c. La idoneidad de una materia prima.
- d. La vida de anaquel de un producto.
- e. Una contaminación humana.

- f. La eficiencia de procesos antimicrobianos.
- g. Violaciones a prácticas sanitarias de operación o distribución (Mossel, 2003).

### **Bacterias mesófilas aerobias (BMA)**

Los microorganismos que forman parte de este grupo son muy heterogéneos. Esta cualidad se deriva de la propia definición del grupo. Se incluyen en él a todos aquellos que muestran capacidad para formar colonias visibles en las condiciones de ejecución de la prueba (medio de cultivo, y tiempo y temperatura de incubación) (Frazier, 1993).

### **Organismos coliformes**

Los organismos coliformes se definen como bacilos gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas dentro de 48 h de incubación a 35°C. Las bacterias más prominentes del grupo pertenecen a géneros de la familia *Enterobacteriaceae* que fermentan la lactosa: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klebsiella* (Doyle, 1997).

La presencia de coliformes en los alimentos resulta de su exposición al medio ambiente (lo que equivale a decir, a los desperdicios orgánicos, cadáveres y desechos animales, excretas humanas, tierra, fauna nociva, aguas negras, residuos en utensilios y equipo) y las posibilidades de desarrollo que encuentren en tales substratos (Bravo, 2004).

### **Coliformes fecales**

Este grupo se refiere a aquellos coliformes que tienen capacidad para fermentar la lactosa con producción de gas a temperaturas de 44-45 °C. Excepto este señalamiento,

los coliformes fecales se identifican con el resto de los coliformes en lo que se refiere a su resistencia al medio ambiente, agentes químicos y factores que favorecen o impiden su desarrollo. El principio que sustenta la idea de utilizar este grupo como un indicador más confiable que los coliformes totales, se apoya en la observación de que un porcentaje más elevado de coliformes aislados de materia fecal humana y de animales de sangre caliente fermenta la lactosa a estas temperaturas, con respecto a los coliformes provenientes de fuentes no fecales: 94 a 99.8% son positivas entre las procedentes de heces de los primeros; contra 14-23% positivos entre las segundas (Geldreich, 1971).

## **Hongos**

La presencia de hongos y levaduras en los alimentos suele asociarse con una exposición a fuentes de contaminación objetables; cifras elevadas son propias además, de alimentos faltos de frescura, alimentos desecados o congelados, productos cárnicos, derivados de cereales y lacticíneos, para los cuales existen normas microbianas. Los hongos se desarrollan preferentemente a una baja  $a_w$  condicionada por la presencia de azúcares se califican de osmófilos (Gourama, 1995).

## **Levaduras**

La expresión del desarrollo de las levaduras en los alimentos se distingue del observado por los hongos. Mientras las primeras pueden proliferar en la masa interna del alimento, los hongos se limitan de ordinario a la superficie. La mayoría de las levaduras desarrollan bien en aerobiosis, los tipos fermentativos prosperan en anaerobiosis. Los límites de temperatura para su multiplicación varían desde algo menos de 0-47°C.y muestran capacidad para crecer en niveles de pH muy ácidos (Bravo, 2004).

## Vigilancia o comprobación microbiológica de los alimentos

Debido a los factores anteriormente mencionados, es necesario establecer límites y/o controles para el análisis microbiológico de grupo de indicadores de calidad de cualquier proceso de producción de alimentos.

Entre los principales puntos para ejecutar métodos de laboratorio correctos y seguros se encuentran diferentes aspectos, que se muestran en la Tabla 4:

**Tabla 4.** Conjunto sistemático de precauciones analíticas que son esenciales para obtener resultados fiables y reproducibles en el análisis microbiológico de las muestras de alimentos.

<p><b>1. Plan de muestreo</b> Obtención de muestras al azar Número a extraer por lote definido previamente</p>	<p><b>6. Comprobación de los medios de cultivo</b> Elección de las cepas prueba Selección de la técnica de inoculación Incubación: tiempo y temperatura Lectura Valores de referencia a usar</p>
<p><b>2. Manipulación antes del análisis</b> Transporte: tiempo y temperatura Pruebas de estabilidad Incubación de botes, latas, etc. Inoculación de las anteriores.</p>	<p><b>7. Técnica de revitalización</b> Composición del medio de revitalización. Programa de tiempo/temperatura Modo de procesado</p>
<p><b>3. Preparación para el análisis</b> Descongelación: tiempo y temperatura; presión para liberar líquido. Limpieza/desinfección de envases</p>	<p><b>8. Técnica de recuento</b> Composición del medio Preparación del medio Esterilización Secado de placas Incubación Lectura Confirmación Expresión de resultados</p>
<p><b>4. Extracción de submuestras</b> Obtención de submuestras al azar. Tamaño de la submuestra Reducción y homogeneización</p>	<p><b>Anexos esenciales a las técnicas</b></p>
<p><b>5. Preparación del macerado y de las diluciones</b> Tamaño de la segunda submuestra.</p>	<p>Justificación y documentación de las técnicas BPL</p>

Preparación del macerado. Composición del líquido de maceración. Técnica. Tiempo / temperatura	Archivo y recuperación de datos
--	---------------------------------

*Mossel, 2003*

**Muestreo.** La información y el estudio de las muestras que van a ser analizadas influye de modo muy importante en su validez y por lo tanto en la calidad de los resultados obtenidos. Por consiguiente, la toma de muestras debe realizarse con tanto cuidado como el propio análisis (Mossel, 2006).

**Transporte y conservación de muestras.** Examinar las muestras sin una demora excesiva. Si no pueden ser analizadas en el laboratorio en el plazo de 1 hora, transportarlas y guardarlas en envases con el adecuado aislamiento cubiertas con una bandeja con bolsas de plástico que contengan cubitos de hielo. Siempre que sea posible, evitar congelar las muestras o guardarlas durante más de 18 horas (Mossel, 2006).

**Preparación de medios de cultivo.** En aquellos casos en los que sea posible, preparar los medios a partir de los productos deshidratados existentes en el comercio. Esto tiene la gran ventaja que se garantiza una composición constante y de que los errores personales se reducen al mínimo. Este punto incluye los cuidados de la esterilización de los medios de cultivo así como el secado de las placas con medios sólidos para la siembra en superficie (Mossel, 2006).

**Técnicas de siembra y confirmación.** Realizar técnicas normalizadas, para el caso de confirmación queda por decir que cuanto mayor es el número de colonias examinadas, tanto mayor es la exactitud del índice de confirmación (Mossel, 2006).

## **Implantación de sistemas de calidad en laboratorio microbiológico**

Los requisitos mencionados anteriormente se pueden englobar en tres grandes grupos: sistemas de control, sistemas de calibración y verificación y sistemas de mantenimiento.

Para lo cual, es necesario tener una definición de calidad y plan de control, según la American Society Quality Control: la calidad la establece como totalidad de funciones y características de un producto o servicio dirigidas a su capacidad de satisfacer las necesidades de un cierto usuario. Se entiende como plan de control: la descripción escrita del sistema para controlar las partes y procesos, refleja además la adhesión de controles basados en la experiencia adquirida.

Una herramienta de calidad que facilita el monitoreo y control de variables, incluyendo métodos o equipos son hojas de control. Se puede definir a la gráfica de control como la comparación gráfica-cronológica (hora a hora, día a día) de la característica actual de la calidad del producto, con los límites que identifican la posibilidad de la manufactura, de acuerdo con las experiencias anteriores que se han obtenido del producto (Feigenbaum, 1978).

Para hacer una aplicación de los conceptos anteriores se puede considerar que el laboratorio es un proceso, donde se pueden definir las cuatro fases fundamentales del mismo como:

- 1) Materia prima/Entrada
- 2) Proceso /Actividades
- 3) Producto /Salida
- 4) Actividades de Control

Así, dependiendo de cuál sea la entrada y salida, el proceso y el sistema de control será diferente (Marco, 2006).

### **Sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos**

Las precauciones analíticas mencionadas se tomarán en cuenta para la implementación de un plan de control de los puntos considerados críticos en el procesamiento de muestras para el análisis microbiológico.

Los problemas microbiológicos pueden presentarse cuando no se alcanza el efecto deseado y esto suele ser consecuencia de errores en los procedimientos de manipulación o de procesado. La detección de dichos errores, su rápida corrección y prevención en el futuro son el principal objetivo de cualquier sistema de control microbiológico (Ducar, 1991).

El control del análisis de riesgos e identificación y control de puntos críticos es un sistema de control de la seguridad alimentaria basado en la prevención, que consiste en identificar dónde se puede presentar un peligro en un proceso determinado, se tiene la oportunidad de establecer las medidas encaminadas a prevenir la aparición del mismo. (Wallace, 2001). El sistema comprende las siguientes etapas secuenciales:

1. Identificación de los riesgos o peligros y valoración de su gravedad y de la probabilidad de su presentación.

*Riesgo o peligro* representa la contaminación inaceptable, el crecimiento inaceptable y/o la supervivencia inaceptable de microorganismos que influyen en la inocuidad o en la alteración, y/o la producción o persistencia inaceptable.



2. Determinación de los puntos críticos de control en los que pueden ser controlados los riesgos o peligros identificados.

*PCC* es un lugar, una práctica, un procedimiento, o proceso en el que puede ejercerse control sobre uno o más factores, que si son controlados, podría reducirse al mínimo o prevenirse un peligro o riesgo.

3. Especificación de los criterios que indican si una operación está bajo control en un determinado PCC.

*Criterios.* Límites especificados de características de naturaleza física (tiempo, temperatura, microbiológica).

4. Establecimiento y aplicación de procedimiento para comprobar que cada PCC a controlar funciona correctamente.

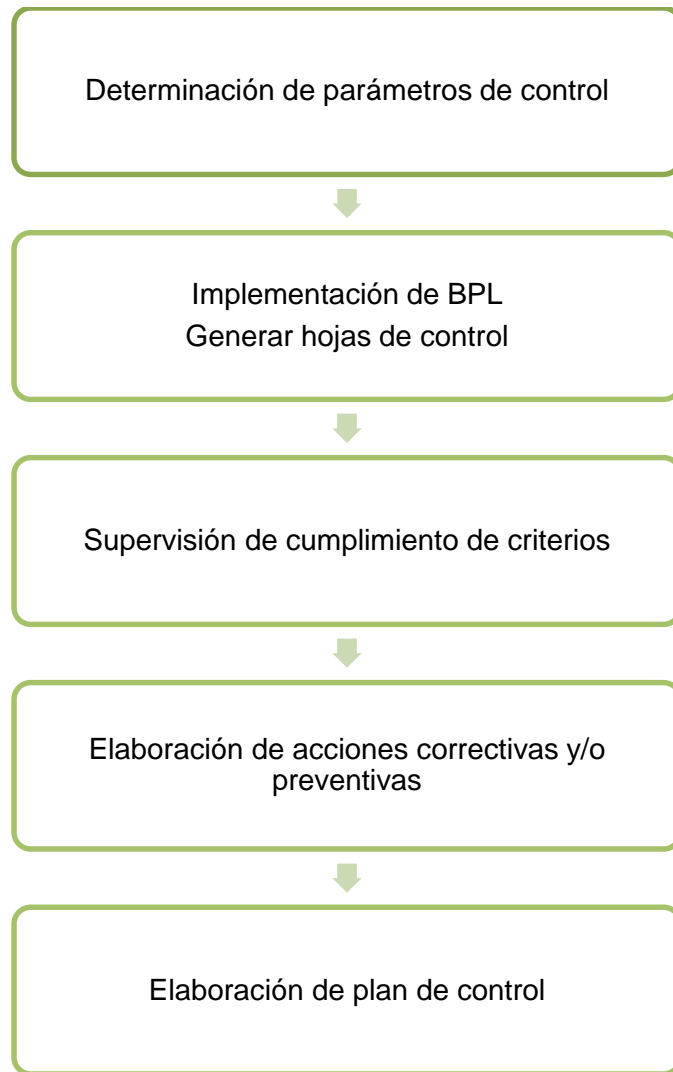
*Comprobación, vigilancia.* Averiguar que un procedimiento en cada PCC se lleva a cabo correctamente. Medición y registro.

5. Aplicar la acción correctiva que sea necesaria cuando los resultados de la comprobación indiquen que un determinado PCC no se encuentra bajo control.

6. Verificación o confirmación, es decir, el empleo de información suplementaria para asegurar que funciona correctamente el sistema (Ducar, 1991).

## **DIAGRAMA DE TRABAJO**

### **Implementación de Plan de Control en un Laboratorio de Microbiología**



**Fig. 2.** Diagrama de trabajo

## **TABLA DE CONTENIDO DE MANUAL**

1. OBJETIVO.
2. ALCANCE
3. POLÍTICAS
4. RESPONSABILIDADES
5. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS
6. REFERENCIAS
7. DIAGRAMA DE PCC DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS
8. PROCEDIMIENTO
  - 8.1 TOMA DE MUESTRAS
  - 8.2 PREPARACION DE MUESTRAS:
  - 8.3 ESTERILIZACION
  - 8.4 SIEMBRA DE MUESTRAS
  - 8.5 INCUBACION
  - 8.6 CONTEO DE COLONIAS
  - 8.7 AREA DE TRABAJO.
    - 8.7.1 CONTROL DE PLACAS.
9. ANEXOS
  - 9.1 Plan de Autocontrol de Laboratorio de Microbiología de Alimentos
  - 9.2 Estandarización de preparación de medios de cultivo
  - 9.3 Información para preparación de medios de cultivo
  - 9.4 Listado de reactivos, soluciones y consumibles
  - 9.5 Hojas de control de equipos
  - 9.6 Programa de calibración

## **METODOLOGÍA**

### **Programa de calibración y mantenimiento de equipos**

De acuerdo a los requerimientos de ISO ((International Organization for Standardization) 17025.

### **Determinación de parámetros de control**

Realizar análisis microbiológico y evaluar factores y/o condiciones a controlar.

### **Implementación de BPL**

De acuerdo a documento Técnico No. 11 de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

### **Elaboración de hojas de control**

**1. Planificación:** En esta fase es donde se determina los parámetros de control, se recopila información relacionada con los objetivos.

**2. Desarrollo:** En esta fase se desarrolla cada una de las actividades necesarias para cumplir con los objetivos establecidos. Aplicación de las normas y procedimientos establecidos.

**3. Conclusión:** Comprende el análisis de los resultados, conclusiones y recomendaciones, así como también la implementación de una matriz para llevar un seguimiento a las actividades y tareas.

Comprende las siguientes actividades:

- 1. Evaluación y ajuste de las hojas de control.
- 2. Verificar que estén todas las actividades.
- 3 Vaciar y documentar toda la información recolectada en la matriz (Consultado en: <http://www.trabajos-pdf5/herramientas-calidad-hoja-control/herramientas-calidad-hoja-control.shtml>)

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se anexa Manual de Implementación de un Plan de Control de Laboratorio de Microbiología como resultado de proyecto de tesina.

El Manual está basado en los requisitos técnicos establecidos en la Norma 17025 poniendo especial énfasis en los siguientes puntos: la toma de muestra, la validación de métodos y la verificación de la trazabilidad.

Bajo ese esquema se trató de cubrir los requisitos siguiendo las categorías establecidas en la Norma, que son:

a. Generalidades: se listan los factores que influyen en la validez y fiabilidad de los análisis y/o calibraciones realizadas por el laboratorio.

b. Personal: el laboratorio debe disponer de una política de formación de su personal, actualizando la descripción de puesto, responsabilidades, conocimientos y experiencia necesaria para su desempeño.

c. Instalaciones y condiciones ambientales. Destacar los requisitos que deben cumplirse incorporando también la toma de muestras, análisis y calibraciones, así como la actividad que se realiza en el laboratorio.

- Debe existir una separación efectiva para áreas adyacentes que realicen actividades incompatibles.

- Adoptar medidas para evitar la contaminación cruzada.

- Controlar el acceso y uso de áreas que puedan influir en la calidad de los análisis y calibraciones.

- Adoptar medidas para asegurar un buen mantenimiento y conservación del laboratorio, incluso elaborar procedimientos especiales en caso necesario.

d. Métodos de análisis, calibración y validación de métodos con apego estricto a los procedimientos.

e. Equipos. El laboratorio debe estar equipado con todos los medios de muestreo y equipos de medida necesarios para la correcta realización de los análisis.

f. Trazabilidad de las medidas. Implementación de registros y organización documental.

g. Muestreo. Disponer de plan de muestreo, procedimiento de muestreo donde se indiquen los factores que deben controlarse para garantizar la validez de los resultados.

h. Manipulación de objetos de análisis y calibración. Conocimiento adecuado para manejo de muestras, almacenamiento y transporte.

Para la interpretación de los resultados de los análisis microbiológicos debe considerarse la validez del análisis, lo cual se determina y se controló por los parámetros considerados como críticos, englobando factores como la representatividad de la muestra y de la porción examinada, la sensibilidad y precisión de las técnicas, la eficacia del analista, la calidad de los medios de cultivo y reactivos, la estabilidad de la temperatura de incubación.

Entre los principales puntos en los que se encontró mayor desviación y por lo tanto, se realizó capacitación y énfasis en el control fueron: defectuoso control de la temperatura en diversos equipos, mala distribución de las cajas en la incubadora, inadecuada esterilización de material, empleo de material con graduación defectuosa, deficiente homogenización de la muestra, malas prácticas en toma y traslado de muestras.

Además de reforzar el programa de capacitación de Buenas Prácticas de Laboratorio, inventario y PEPS de reactivos y programa de calibración y mantenimiento de equipos, para disminuir cualquier alteración que conduzca a un resultado de análisis microbiológico erróneo.

Entre los beneficios de la realización y ejecución del manual se logró identificar los elementos esenciales que intervienen en la obtención de resultados, y conseguir una uniformidad de criterios para la operación y toma de decisiones. El Manual elaborado se tiene como material de apoyo siendo una guía práctica de los procedimientos de operación señalando los puntos que necesitan controlarse, abarcando desde el muestreo hasta la lectura, evitando así alguna alteración o deterioro de las muestras, por ejemplo.

Además permitió definir la organización en la realización de actividades con una documentación de referencia que sirva de recordatorio en caso de duda en la realización. Establece funciones y responsabilidades, se fijan criterios de aceptación, supervisión de cumplimiento de criterios.

Con lo anterior, también se realiza un avance en la capacitación del personal de nuevo ingreso, ya que, se tiene definido por escrito las actividades a realizar evitando olvidar detalles como pasa en una capacitación sin evidencia documental. Así se logra una estandarización de las actividades, y que independientemente de la persona que las realice se utilicen los mismos criterios en la toma de decisiones, volviendo al personal especializado en sus actividades y a nuestro procedimiento trazable.

Otro avance importante, fue detectar en los puntos a evaluar el acondicionamiento y mejora de las instalaciones del laboratorio y sus condiciones ambientales para cumplir



con los requisitos para desarrollo de análisis microbiológico, trabajando en conjunto con programas como calibración y mantenimiento preventivo de equipos, garantizando de esta manera que las mediciones sean correctas, y pueden ser usados cuando sea requerido.

Con la estandarización y cumplimiento de los procedimientos se mejoró la calidad de obtención de los resultados de análisis microbiológicos, así como reducir costos al evitar remuestreos y repeticiones de análisis para comprobación de resultados. Se detectaron oportunidades de mejora o posibles fallos y establecer un programa de Auditorías internas para una evaluación del cumplimiento de los requisitos acordados, ensayos de comparación de resultados entre personal y laboratorios externos.

## **CONCLUSIÓN**

- Se realizó el análisis de puntos críticos para procedimiento de análisis microbiológico de muestras.
- Se logró el control de los puntos identificados desarrollando formatos de verificación como hojas de control y formatos de apego a procedimientos.
- Se dio seguimiento a las verificaciones de los puntos identificando las incidencias en incumplimientos de parámetros y se establecen acciones correctivas y/o preventivas para lograr la mejora continua.
- Se elaboró un plan de control de fácil acceso, guías de trabajo y ayudas visuales para su ejecución y cumplimiento.

- Se desarrolló la implementación de un plan de control en un laboratorio de microbiología documentado en el manual que se anexa, logrando la mejora de calidad de los análisis microbiológicos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Aguiar, M. 2009. Recomendaciones para la implantación de la normativa de la calidad ISO 15189 en el Laboratorio de Microbiología Clínica. SEIMC.

Bravo, F. 2004. El manejo higiénico de los alimentos. Editorial Limusa, México, pp. 115.

Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica. Washington, DC: OPS, 2012. (Red PARF Documento Técnico N° 11).

Christian, J.H.B. 1963. Water activity and the growth of microorganisms. In Recent Advances in Food Science. Ed. J.M. Leitch and D.N. Rhodes. London. Vol. 3, 248-255.

Doyle, M. P. 1997. Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras. Acribia. Zaragoza. pp. 799.

Ducar, P.M. 1991. El sistema de análisis de riesgos y puntos críticos. Acribia, España, pp.332.

Escartin, F. E. 2000. Microbiología e inocuidad de los alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro, México, pp. 96-103.

Feigenbaum, A.V. 1978. Control total de la calidad. Ingeniería y administración. Compañía Editorial Continental, S. A., México, pp. 283-319.

Fernández, G. Q. 1986. Microbiología de los alimentos, Universidad de la Habana. Facultad de Farmacia y alimentos. Habana, pp. 251.

Frazier, W.C. 1993. Microbiología de los alimentos. Acribia, Zaragoza, pp. 681.

Geldreich, E. 1971. Fecal contamination of fruits and vegetables during cultivation and processing for market, review. Journal of milk and food technology , 34 (4): 184-1195.

Gourama, H., Bullerman, L. B. 1995. Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: a review: Journal of Food Protection 58, 1395-1404.

James, M. J. 2005. Microbiología moderna de los alimentos. 5ª. ed. Acribia, Zaragoza pp. 28-40.

Marco, J.E. 2006. Implantación de sistemas de calidad de laboratorio microbiológico. Normas ISO 9001-2000 e ISO 17025. Analiza Calidad, España.

Mossel, D.A. 2003. Microbiología de los alimentos. Acribia, España, pp. 397-593.

NORMA INTERNACIONAL ISO/IEC 17025. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.

Park, S. 1995. Role of glycine betaine and related osmolytes in osmotic stress adaptation. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:4378-4381.

Roberts, D. 2000. *Microbiología práctica de los alimentos*. Acribia. Zaragoza, pp. 276.

Rose, A. H. 1965. *Chemical Microbiology*. Butterworths. London, capítulo 3.

Walden, W. C. 1975. Differential effects of oxygen and oxidation-reduction potential on the multiplication of three species of anaerobic intestinal bacteria. *Appl. Microbiol.* 30:781-785.

Wallace, C. Mortimore, S. 2001. *HACCP: Enfoque práctico*. Acribia, España, pp. 427.

Wodzinski, R.J. 1961. Moisture requirements of bacteria. II. Influence of temperature, pH, and maleate concentration on requirements of *Aerobacter aerogenes*. *Frazier*. PP. 353-358.

Referencias web: <http://www.trabajos-pdf5/herramientas-calidad-hoja-control/herramientas-calidad-hoja-control.shtml>

**PLAN DE CONTROL DE UN  
LABORATORIO DE  
MICROBIOLOGÍA**

# PLAN DE CONTROL DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS

## ÍNDICE

1. OBJETIVO .....	2
2. ALCANCE .....	2
3. POLÍTICAS .....	2
4. RESPONSABILIDADES .....	2
5. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS .....	3
6. REFERENCIAS .....	7
7. DIAGRAMA DE PCC DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS .....	8
8. PROCEDIMIENTO.....	9
8.1 TOMA DE MUESTRAS.....	9
8.2 PREPARACION DE MUESTRAS: .....	17
8.3 ESTERILIZACION .....	18
8.4 SIEMBRA DE MUESTRAS .....	19
8.5 INCUBACION .....	33
8.6 CONTEO DE COLONIAS.....	34
8.7 AREA DE TRABAJO.....	35
8.7.1 CONTROL DE PLACAS.....	36
9. ANEXOS.....	37
9.1 Plan de Autocontrol de Laboratorio de Microbiología de Alimentos .....	37
9.2 Estandarización de preparación de medios de cultivo.....	40
9.3 Información para preparación de medios de cultivo.....	42
9.4 Listado de reactivos, soluciones y consumibles .....	43
9.5 Hojas de control de equipos.....	46
9.6 Programa de calibración.....	55

## **1. OBJETIVO.**

Establecer política, procedimientos, frecuencias, valores de referencia para garantizar resultados confiables de análisis microbiológico de muestras.

## **2. ALCANCE**

Personal de laboratorio de microbiología, área de compras, encargado de metrología.

## **3. POLÍTICAS**

3.1 Es responsabilidad del Departamento de Aseguramiento de Calidad que este procedimiento sea cumplido.

3.2 Todo analista de laboratorio debe cumplir las actividades de aseguramiento y control del programa. Así como documentación y acciones planificadas y sistemáticas.

## **4. RESPONSABILIDADES**

4.1 Es responsabilidad del encargado del laboratorio de microbiología el cuidado del mismo.

4.2 Es responsabilidad del encargado de Microbiología asegurar el correcto desecho y resguardo de materiales, muestras y siembras que se tienen en laboratorio, así como de tomar las medidas necesarias al momento de muestrear y/o de trasladar las muestras para su análisis o desecho con el fin de prevenir cualquier tipo de contaminación.



## 5. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

La microbiología Sanitaria es una disciplina deficientemente aplicada en la vigilancia y control de los alimentos, así como en la prevención de enfermedades transmisibles por los alimentos en nuestro país.

El presente manual pretende ser una ayuda accesible a todo aquel interesado en el área de los análisis microbiológicos del agua y alimentos. Por tal motivo se describen las técnicas oficiales de análisis.

a) **MICROBIOLOGIA SANITARIA.-** Estudia los microorganismos presentes en el agua y en los alimentos, considerando sus características generales, su ecología, su resistencia al medio ambiente, su capacidad para sobrevivir y desarrollar en los propios alimentos, las consecuencias de ese desarrollo y los factores que influyen en todo esto.

Actualmente son 4 los grupos de interés sanitario, los que llenan el campo de acción de la Microbiología Sanitaria:

- ✓ Microorganismos deterioradores
- ✓ Microorganismos indicadores
- ✓ Microorganismos patógenos
- ✓ Microorganismos útiles para el hombre

**MICROORGANISMOS DETERIORADORES.-** Son aquellos que afectan las características organolépticas de los alimentos, con ellos se estudian los tipos de procesos que tiene lugar, las causas que los propician y desencadenan y los medios para evitarlos y controlarlos.

**MICROORGANISMOS INDICADORES.-** Son aquellos que se agrupan en función de ciertas características morfológicas, fisiológicas, ecológicas a través de los

cuales adquieren un significado especial. Estos grupos de microorganismos se consideran indicadores de fuentes de contaminación indeseable o de otro tipo de accidente que sugiere la comisión de mala practicas higiénicas de trabajo durante el manejo del agua y de los alimentos.

**MICROORGANISMOS PATOGENOS.-** Son definidos como aquellos que pueden causar algún daño a la salud.

**MICROORGANISMOS UTILES PARA EL HOMBRE.-** Son aquellos que se han adicionado intencionalmente a los alimentos con el propósito de proporcionar alguna característica organoléptica especial

b) **LABORATORIO MICROBIOLOGIA SANITARIA.-** Dentro de la Epidemiología y Tecnología de Alimentos, es un valioso recurso en cuestiones tales como:

- ✓ Control de la calidad sanitaria de materias primas e ingredientes
- ✓ Control de la potabilidad desde el punto de vista bacteriológico del agua
- ✓ Diagnóstico de la calidad sanitaria de un producto terminado
- ✓ Diagnóstico diferencial de la causa de alteración de un alimento y/o bebida
- ✓ Evaluación de la eficiencia de los procesos de lavado y desinfectado del equipo, utensilios y superficies de trabajo
- ✓ Evaluación de la eficiencia de los procesos de esterilización
- ✓ Diagnóstico de portadores asintomáticos de microorganismos patógenos entre el personal que maneja alimentos
- ✓ Diagnóstico diferencial de la causa de un brote de gastroenteritis y otro tipo de infecciones o intoxicaciones asociadas al consumos de agua y alimentos
- ✓ Rastreo de fuentes de contaminación

Los resultados del laboratorio dependen de:

- ✓ Las condiciones en que se efectuó el muestreo y el transporte de la muestra

- ✓ La técnica de análisis utilizada
- ✓ La calidad de los reactivos y medios de cultivo
- ✓ La destreza del técnico que ejecuta el análisis
- ✓ El apego que observe el analista a la técnica prescrita

- c) **BACTERIAS:** Son microorganismos procariotas de organización muy sencilla, unicelulares pertenecientes al Reino Mónera
- d) **HIGIENE:** Quitar la mugre
- e) **SANITIZACION:** Lavar y desinfectar
- f) **E.T.A:** Enfermedad transmisible por alimentos
- g) **RIESGO:** Probabilidad de sufrir daño
- h) **RIESGO ACTUAL:** Mediado por agentes patógenos(hoy)
- i) **RIESGO POTENCIAL:** Mediado por microorganismos indicadores
- j) **ALIMENTO SANO O INOCUO:** Alimento libre de Agentes Patógenos
- k) **ALIMENTO DESCOMPUESTO:** Alimentos con sus características organolépticas alteradas
- l) **ALIMENTO CONTAMINADO:** Presencia de algún componente ajeno a su composición natural u autorizado
- m) **AGENTE PATOGENO:** Aquel que nos causa daño (físicos, químicos, microorganismos)
- n) **B.M.A :** Bacterias Mesofilicas Aerobias, crecen entre 20° a 40°C en presencia de O<sub>2</sub>, tiene capacidad de formar colonias visibles, son un grupo mayoritario
- o) **COLIFORMES:** Bacilos Gram negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas dentro de las primeras 48 h de incubación a 35°C, ocasionando en las colonias desarrolladas el vire del indicador rojo neutro presente en el medio y la precipitación de las sales biliares. La presencia de coliformes en agua es de origen fecal y en alimentos es por malas prácticas de higiene.
- p) **COLONIAS:** Agrupamiento de células en forma de mesas visibles sobre el Agar de cultivo.

q) **MEDIO DE CULTIVO:** Base o sustrato que tiene elementos, nutrientes para el desarrollo de microorganismos, como en este caso B.M.A, Coliformes Total, Hongos y Levaduras. Los podemos encontrar en forma de Gel, líquidos o para hidratar. Existen varios tipos de medios de cultivo como:

- ✓ Pre-enriquecimiento
- ✓ Enriquecimiento
- ✓ Selectivos y diferenciales
- ✓ Simples
- ✓ Transporte

r) **HONGOS:** Grupo de hongos microscópicos; organismos pertenecientes al reino Fungí, que se caracterizan por tener un cuerpo formado por estructura filamentosa con ramificaciones, que se conocen con el nombre de micelio, el conjunto de micelios constituyen la hifa, carecen de clorofila, se alimentan por absorción pudiendo propagarse por esporas flageladas o no, las paredes celulares pueden ser de queratina, celulosa y/o mañana, Crecen formando colonias en un medio selectivo, estos se desarrollan menos rápido que las bacterias. Se analizan en alimentos debido a su nivel de mico toxinas.

Si hay mucha cantidad de hongos eso indica que hay falta de frescura. Tienen un pH óptimo de 5 – 6 a una Temperatura de -6 a > 70°C

s) **LEVADURAS:** Las levaduras son hongos unicelulares, su reproducción es normalmente por gemación, son cremosas y los colores que presentan son blancos, beige o un poco más oscuros, algunas son rosadas o rojas. Existen dos tipos de levaduras, las aerobias y las anaerobias, estas últimas son causantes de la fermentación

Su temperatura de crecimiento es de < 0 a < 47°C, las levaduras Cromógenas son dañinas al organismo.

t) **MUESTRA:** Número total de unidades de producto provenientes de un lote y que representan las características y condiciones del mismo.

u) **SUPERFICIES VIVAS:** Las áreas del cuerpo humano que entran en contacto con el equipo, utensilios y alimentos durante su preparación y consumo.

- v) **UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC):** Término que debe utilizarse para reportar la cuenta de colonias en placa, las cuales pueden surgir de una célula o de un cúmulo de células.

## **6. REFERENCIAS**

6.1 Libro rojo del Corporativo

6.2 **NOM-110-SSA1-1994** "BIENES Y SERVICIOS. PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO"

6.3 **NMX-F-255-1978** "METODO DE CONTEO PARA HONGOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS"

6.4 **NOM-127-SSA1-1994** "SALUD AMBIENTAL, AGUA PARA USO Y CONSUMO HUMANO-LIMITES PERMISIBLES DE CALIDAD Y TRATAMIENTOS A QUE DEBE SOMETERSE EL AGUA PARA SU POTABILIZACION".

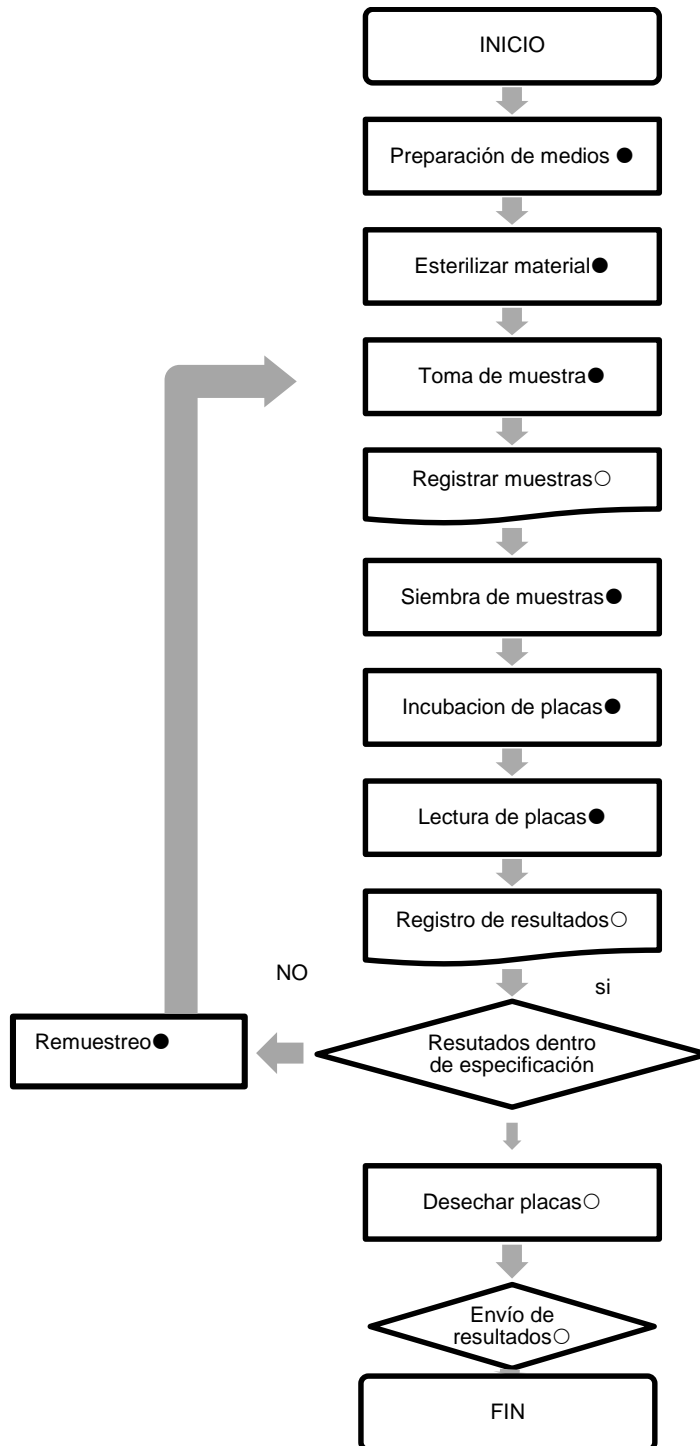
6.5 NOM180 S-AS-1 1998 SALUD AMBIENTAL. AGUA PARA USO Y CONSUMO HUMANO. EQUIPOS DE TRATAMIENTO DE TIPO DOMESTICO. REQUISITOS SANITARIOS.

6.6 NOM-111-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE MOHOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS.

6.7 NOM-092-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA.

6.8 NOM-113-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES EN PLACA.

## 7. DIAGRAMA DE PCC DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS



**Fig. 1** Diagrama de procesamiento de muestras

En la Figura 1 se muestra el proceso general de tratamiento de muestras microbiológicas, identificando con un punto negro ● un punto crítico importante, y

con punto blanco ○ los puntos críticos poco importantes. Dichos puntos críticos son determinantes para la obtención de resultados de análisis microbiológicos confiables.

## **8. PROCEDIMIENTO**

1. Se esteriliza material siguiendo procedimiento del punto 8.3.
2. Se toman las muestras a sembrar de acuerdo al programa y técnica de muestreo.
3. Se registran las muestras en el formato correspondiente.
4. Se siembra muestra de acuerdo a la técnica requerida.
5. Incubar la caja Petri de acuerdo a cada técnica o el microorganismo buscado.
6. Leer el crecimiento que se tengan en las placas de siembra.
7. Registrar los resultados en el formato correspondiente.
8. Si es requerido realizar confirmación de algunas bacterias (Coliformes, bacterias ácido lácticas), realizarlo de acuerdo a las técnicas establecidas.
9. Las placas se envuelven en papel, se esterilizan en horno de secado a 175°C durante 90min.
10. El material es lavado y de ser necesario se esteriliza a 121°C ± 1°C durante 15min

### **8.1 TOMA DE MUESTRAS**

#### **VALVULAS DE LLENADORA:**

Estas muestras se toman después de realizar un proceso de saneamiento a la máquina después de verificar que el agua de enjuague no contenga ninguna concentración del detergente o sanitizante utilizado para esta actividad. La toma se realiza de acuerdo a lo siguiente:

- a) Abrir la válvula y dejar correr agua aproximadamente por 10 segundos.

- b) Limpiar la bolsa Whirl-Pack con una torunda de alcohol y retirar la cinta de seguridad.
- c) Abra la bolsa con ayuda de las tiras blancas y llene bolsa al 80% de su capacidad evitando goteos por condensación.
- d) Cierre la bolsa con ayuda de las tiras amarilla.
- e) Anote en una etiqueta No. de la válvula, línea de producción y fecha de toma de muestra.
- f) Realice el procedimiento anterior con el número de muestras necesarias.
- g) Colocar muestras en refrigerador de microbiología.

**NOTA:** antes de tomar muestras lavarse las manos y limpiarse las manos con una torunda de alcohol. Tomar la muestra de agua de enjuague con la mínima presión de CO<sub>2</sub>.

## **TOMA DE MUESTRA EN TRATAMIENTO DE AGUA**

### **Agua no tratada (pozos)**

- a) Sanitizar las llaves de salida de muestra con cloro y alcohol.
- b) Cuando el punto de muestreo lo permita realiza técnica de muestreo por flama.
- c) Abrir las llaves de salida de muestra y permitir que un poco de líquido se derrame.
- d) Abrir la bolsa estéril, previamente sanitizada cerca de la muestra. En el caso de osmosis entrada y salida, salida de filtro de carbón entrada se deben de usar bolsas estériles con thio-bag con pastilla de tiosulfato.
- e) Cerrar perfectamente la bolsa, rotulando: Muestra y fecha del análisis.
- f) Trasladar las muestras al laboratorio en un recipiente limpio y seco.

**NOTA:** Tomar muestra con guantes estériles y sujetarse a la BPM'S



## **TOMA DE MUESTRA EN MATERIA PRIMA**

### **Tapa lata y tapa rosca**

- a) Abrir bolsa estéril cerca de la muestra.
- b) Tomar una tapa y se mete a la bolsa Whirl-Pack
- c) Agregar agua estéril.
- d) Cerrar perfectamente la bolsa, rotulando: Muestra, fecha del análisis.

### **Envase lata**

- a) Se abre el playo de un pallet de lata.
- b) Se abre una bolsa whil park de 500ml y se coloca en la boca de la latas y se tapa el orificio que se le haga al plástico del emplaye.
- c) En la campana de flujo laminar encendida se agregar agua estéril a la lata
- d) Agitar la lata para limpiar las paredes de estas por 1 min y el agua se filtra.

### **Concentrado**

- a) Sanitizar perfectamente el porrón contenedor con una torunda de alcohol.
- b) Abril el contenedor del concentrado con cuidado.
- c) Abrir la bolsa Whirl-Pack cerca de porrón (teniendo precaución de que la bolsa no toque la superficie del contenedor).
- d) Vaciar una cantidad de concentrado.
- e) Cerrar perfectamente la bolsa, rotulando: Muestra y fecha del análisis.
- f) Cerrar el contenedor del concentrado.

### **Azúcar Refinada**

- a) Limpiar la superficie del saco de azúcar con una torunda de alcohol.
- b) Abril el saco de una de las puntas de la costura.

- c) Abrir una bolsa Whirl-Pack cerca del saco de azúcar y vaciar una porción.
- d) Cerrar la bolsa y rotularla con lote y fecha de muestreo.
- e) Cerrar el saco para evitar contaminación.

NOTA: Si al abrir el saco es muy grande colocar una gasa estéril y después cinta adhesiva.

## **Fructosa**

- a) Limpiar la válvula de purga de la pipa con una torunda de alcohol (de adentro hacia afuera para evitar contaminación del punto de muestreo).
- b) Abrir la llave o válvula de purga y dejar escurrir el líquido por 20 segundos (para evitar residuos de alcohol).
- c) Abrir una bolsa Whirl-Pack previamente sanitizada con una torunda de alcohol.
- d) Tomar la muestra al 80% de la capacidad de la bolsa Whirl-Pack.
- e) Cerrar la bolsa y rotular con la fecha de toma de muestra, nombre de la muestra.
- f) Para sembrar hay que diluir 10ml de fructosa en 90ml de agua estéril (dilución 1:10).

**NOTA:** para la toma de muestra del **tanque de fructosa** se realiza el mismo procedimiento solo que la salida de la tubería de fructosa que se encuentra en la sala de jarabes por que el tanque no cuenta con válvula de purga).

## **Azúcar Líquida**

- a) Limpiar la válvula de purga de la pipa con una torunda de alcohol (de adentro hacia afuera para evitar contaminación del punto de muestreo).
- b) Abrir la llave o válvula de purga y dejar escurrir el líquido por 20 segundos (para evitar residuos de alcohol).
- c) Abrir una bolsa Whirl-Pack previamente sanitizada con una torunda de alcohol.
- d) Tomar la muestra al 80% de la capacidad de la bolsa Whirl-Pack.

- e) Cerrar la bolsa y rotular con la fecha de toma de muestra, nombre de la muestra.
- f) Para sembrar hay que diluir 10ml de azúcar líquida en 90ml de agua estéril (dilución 1:10).

**NOTA:** para la toma de muestra del **tanque de azúcar líquida** se realiza el mismo procedimiento solo que la salida de la tubería de fructosa que se encuentra en la sala de jarabes por que el tanque no cuenta con válvula de purga).

### **Sales o Ingredientes secos**

- a) Verificar que el empaque se encuentre en cerrado.
- b) Se abre el empaque con cuidado.
- c) Se limpia una bolsa Whirl Pack con una torunda de alcohol.
- d) Se toma la muestra de una de las puntas del empaque. .
- e) Se cierra la bolsa y se rotula con el nombre de la muestra. .
- f) Se cierra el empaque.

**NOTA:** La muestra se tiene que tomar con guantes estériles desechables. .

### **TOMA DE MUESTRA EN EL AREA DE JARABES**

#### **Jarabe Simple y Terminado**

- a) Sanitizar las llaves de salida de la muestra con torundas de alcohol (de adentro hacia fuera).
- b) Abrir las llaves de salida de muestra y permitir que un poco de líquido se derrame.
- c) Abrir la bolsa Whirl-Pack previamente sanitizada cerca de la muestra.
- d) Cerrar perfectamente la bolsa, rotulando: Muestra y fecha del análisis.

**Nota:** para el jarabe terminado elegir del pizarrón del área de jarabe uno de los tanques que sean para la línea de lata o pet de acuerdo a programa

### **TOMA DE MUESTRA DE PRODUCTO TERMINADO**

- a) Se trata de producto envasado se toman 1 muestras al azar durante la corrida de la producción en las líneas ya sea lata y/o botella verificando el lote y la fecha de caducidad
- b) Trasladarlas al laboratorio en un recipiente limpio y seco.

### **TOMA DE MUESTRA DEL PERSONAL**

- a) Se toma un hisopo con agua peptonada estéril.
- b) Se truenan la parte superior del hisopo para trasladar el agua peptonada a la parte inferior del hisopo y humedece la punta del mismo.
- c) Limpie con el hisopo en forma de barrido o frotis la palma de la mano de atrás para adelante.
- d) Reintroduce el hisopo en su empaque.
- e) Rotular el tubo con muestra y fecha del análisis.

### **TOMA DE MUESTRA PAR AMEDIO AMBIENTE**

- a) Se traslada al área a analizar con el equipo para filtrar aire AirPort DM8 y las placas necesarias.
- b) Se coloca el adaptador al equipo y posteriormente se limpia con una torunda de alcohol.
- c) Se abre la bolsa de la placa con el medio a usar con la ayuda de unas tijeras limpias con alcohol. .
- d) Se coloca la placa sobre el adaptador.

- e) Una vez que el equipo termino retirar la placa y colocarla en la bolsa y cerrarla con una cinta.
- f) La placa se traslada al laboratorio de microbiología.
- g) En la campana limpia se coloca su cubierta se rotula y se incuba.

**NOTA:** Los códigos de las placas son para las siguientes determinaciones:

Cuenta Total No. 14320-110----AC

Hongos y Levaduras No. 14321-110----AC

### **TOMA DE MUESTRA DE AIRE ESTERIL**

- a) Se limpia la superficie de la válvula de purga con una torunda de alcohol.
- b) Se abre la llave y se deja purgar por 10 segundos
- c) Se toma un hisopo esterilizado y se pone en contacto en el aire por 30segundos.
- d) Se guarda hisopo con agua peptonada.
- e) Se rotula tubo de ensaye con fecha y punto de muestreo.

### **TOMA DE MUESTRA DE ENJUAGUES LATA Y BOTELLA**

#### **Enjuague de lata**

- a) Se pide a operador de la línea que disminuir la velocidad de la llenadora.
- b) Se abre acrílico que cubre transportadores de línea después del enjuague.
- c) Se toman una latas y se colocan una bolsa whirl park en la boca de la lata, rotular muestra
- d) En la campana de flujo laminar previamente esterilizada se realiza un enjuague de lata con agua estéril.
- e) El agua se filtra.

## **Enjuague de botella**

- a) Se pide a operador que disminuya la velocidad de la llenadora.
- b) Se sacan las botellas del transportador y se coloca una bolsa whirl parck en la boca de la botella se rotula.
- c) En la campana de flujo laminar previamente esterilizada se realiza un enjuague de botella con agua estéril.
- d) Se coloca aproximadamente 300ml de agua estéril en la botella.

## **TOMA DE MUESTRA DE SUPERFICIES INERTES (Engargoladora o encapsuladora)**

- a) Se toma un hisopo con agua peptonada.
- b) Romper la parte superior del hisopo para pasar el agua peptonada a la parte inferior del hisopo y humedecer el hisopo.
- c) Frotar la superficie de la maquina aproximadamente 10cm<sup>2</sup>.
- d) Colocar el hisopo en su empaque y rotular.

## **TOMA DE MUESTRAS DE REMINERALIZADOR**

- a) Se limpia la válvula con una torunda de alcohol empezando por la parte interior hacia fuera (para evitar contaminar la muestra).
- b) Se limpia la bolsa Wihirl-Pack con una torunda de alcohol la parte donde se abre la bolsa.
- c) Se abre la válvula toma muestra y se deja caer el flujo unos 15 seg. para remover el residual de alcohol.
- d) Se abre la bolsa Whirl-Parck y se llena la bolsa  $\frac{3}{4}$  de su capacidad y posteriormente se cierra.

## **8.2 PREPARACION DE MUESTRAS:**

### **a) JARABE TERMINADO, JARABE TERMINADO, FRUCTOSA, CONCENTRADOS, AZUCAR REFINADA**

Tomar con una pipeta 10ml o pesar 10g de la muestra y se colocan en el frasco o bolsa estéril que contiene 90ml de agua estéril al abrigo del mechero y se agita vigorosamente. Cuando se trata de azúcar refinada o estándar se toman 10 g. de muestra y asépticamente al abrigo del mechero se agregan a un frasco con 90ml. de solución diluyente.

### **b) PRODUCTO TERMINADO**

Solamente en el caso de que el producto sea muy viscoso como jugos se tendrá que realizar una dilución 1:10, el demás producto se siembra de forma directa.

### **c) BOTELLA, LATA**

Vaciar aproximadamente 100ml de agua estéril en la botella o lata, en el caso de botella agitar vigorosamente procurando que el agua haga contacto con las paredes, en el caso de latas mover de forma circular para que la pared de la lata tenga contacto con el agua durante 1min., dejar que repose el agua durante 2min., y volver a realizar el procedimiento de agitación en total 3 veces.

### 8.3 ESTERILIZACION

1. Verificar que la autoclave tenga la cantidad de agua para el proceso de esterilización (al ras del soporte para la bandeja).
2. Colocar el indicador de temperatura en 7.
3. Colocar en la bandeja de carga el material que se va a esterilizar.
4. Las soluciones tienen que estar identificados con nombre, fecha de preparación.
5. Los recipientes tienen que tener cinta testigo.
6. Se coloca en una caja petri de vidrio algodón donde se coloca termómetro de máximas y el control biológico (este solo se coloca en la primer carga del día).
7. Cerrar la autoclave.
8. Encender la autoclave con el botón de ON.
9. Colocar la válvula de alivio de forma vertical y cambiar posición a horizontal hasta que saque vapor.
10. Dejar que suba temperatura a 121°C y a partir de esta temperatura contar 15min.
11. Una vez transcurrido el tiempo apagar autoclave con el botón de OFF.
12. Dejar que baje la temperatura a cero.
13. Abrir autoclave.
14. Registrar temperatura del termómetro de máximas en el formato correspondiente.
15. Revisar el cambio de color de la cinta testigo a café fuerte.
16. El control biológico se coloca en la incubadora Attest que se debe de encontrar a 56°C durante 48hrs., donde si cambio a un color violeta el proceso de esterilización fue optimo y si cambio a un color amarillo el proceso de esterilización no fue adecuado.

#### PUNTOS CRITICOS:

Control Biológico

Temperatura



Cinta testigo

Nota: el termómetro tiene que estar calibrado.

## **8.4 SIEMBRA DE MUESTRAS**

### **a) FILTRACION POR MEMBRANA**

1. Encender campana de flujo laminar 20 minutos antes de iniciar a trabajar.
2. Limpieza de campana de flujo laminar con torundas de alcohol y pinzas.
3. Rotular placas petri con los diferentes medios de cultivos necesarios (los cuales deben de estar atemperados).
4. Encender esterilizador o lámpara UV por 10min.
5. Colocar manifold en campana de flujo laminar, limpiar con torunda de alcohol.
6. Conectar sistema de filtración (matraz kitazanto, bomba de vacío).
7. Colocar embudo y vaso de filtración.

Primero colocar una placa petri estéril sobre la mesa de trabajo, abrir frasco (donde se esterilizo material) con las pinzas tomar el vaso de la parte de abajo del esmeril por fuera escurrir para eliminar la mayor cantidad de agua, colocar sobre tapa de caja petri y tapar con la otra parte de la caja petri para evitar algún tipo de contaminación del vaso.

Posteriormente sacar el embudo con ayuda de la pinza de la parte de la goma, escurrir (se puede tocar embudo de la parte de la goma o tubo), colocar sobre el soporte del manifold.

Ya colocado el embudo retirar tapa de la parte del esmeril del vaso para colocar vaso sobre embudo de filtración y fijar con pinzas.

8. Repetir procedimiento del punto 7 cuantas veces sea necesario.
9. Colocar pinza para tomar membrana en un vaso de precipitados de 100ml con alcohol para dejar pinzas en él. Para ocuparlas eliminar la mayor cantidad de alcohol con golpes sobre el labio del vaso.
10. Antes de iniciar con la filtración de muestras meter un BLACO con agua estéril.
11. Rotular cajas petri.

12. Colocar con ayuda de pinzas membrana de celulosa sobre el embudo de filtración, por lo que primero hay que retirar pinza y vaso (sin dejar de sostener vaso y evitar algún tipo de contaminación de la parte esmerilada). Ya depositada la membrana colocar de nuevo vaso y pinza.
13. Repetir el paso 10 cuantas veces sean necesarias.
14. Limpiar muestra de acuerdo a:
  - Para muestras en bolsas: limpiar con gasa y alcohol, abrir y limpiar con torunda de alcohol antes de abrir.
  - Para muestras en bote y botellas: limpiar con gasa y alcohol.
  - Para latas: limpiar con gasa y alcohol, flanear tapa de la lata colocar una pequeña cantidad de alcohol sobre la tapa y encender, dejar que se consuma el alcohol.
15. Agitar muestra vigorosamente para homogenizar muestra.
16. Abrir muestra y depositar cantidad de muestra necesaria (10ml, 100ml o 250ml) en el vaso de filtración retirando la caja petri y vertiendo la muestra sobre el vaso, volver a colocar tapa, repetir operación las veces que sean necesarias.
17. Abrir válvula de paso del maniful y encender bomba de vacío.
18. Dejar que se filtre la muestra, cerrar válvula de paso del maniful y apagar bomba de vacío.
19. Retirar membrana y colocar en caja petri con medio de cultivo cuidando que no queden burbujas de aire entre el medio y la membrana.
20. Repetir los pasos 11, 14, 15 y 16 cuantas veces sea necesario para la misma muestra.
21. Enjuagar vaso y embudo de filtración con una cantidad mayor a lo filtrado de agua estéril.
22. Retirar vaso y embudo, colocar en esterilizador o lámpara UV durante 3 min.
23. Posterior al tiempo de esterilización el embudo y vaso se puede ocupar para filtrar una muestra nueva.
24. Colocar cajas petri en vaso y embudo antes de montar para evitar contaminación de los mismos y repetir pasos 11, 14, 15 y 16.

25. Las placas en que se van a determinar hongos colocarlas en bolsas de plástico para incubar (boca arriba).

26. Incubar placas de acuerdo a cada microorganismo (temperatura y tiempo).

27. Después del tiempo de incubación leer placas.

Cuenta Total, contabilizar todas las colonias, si no hay crecimiento reportar como  $< 1$  UFC/volumen filtrado, si la placa no se puede contar reportar como  $>100$  UFC/volumen filtrado.

Coliformes, contabilizar todas las colonias, si no hay crecimiento reportar como  $< 1$  UFC/volumen filtrado, si la placa no se puede contar reportar como  $>100$  UFC/volumen filtrado.

### **PUNTOS CRITICOS:**

Material Estéril

Blanco al inicio de corrida con Agua estéril

No burbujas de aire entre placa y el medio de cultivo.

### **b) FILTRACION POR MEMBRANA PARA GERMENES MESOFILOS AEROBIOS (AGAR Yeast nestle agua)**

1. Encender campana de flujo laminar 20 minutos antes de iniciar a trabajar.
2. Limpieza de campana de flujo laminar con torundas de alcohol y pinzas.
3. Rotular placas petri con los diferentes medios de cultivos necesarios (los cuales deben de estar atemperados).
4. Encender esterilizador o lámpara UV por 10min.
5. Colocar manifold en campana de flujo laminar, limpiar con torunda de alcohol.
6. Conectar sistema de filtración (matraz kitazato, bomba de vacío).
7. Colocar embudo y vaso de filtración.

Primero colocar una placa petri estéril sobre la mesa de trabajo, abrir frasco (donde se esterilizo material) con las pinzas tomar el vaso de la parte de abajo del esmeril por fuera escurrir para eliminar la mayor cantidad de agua, colocar

sobre tapa de caja petri y tapar con la otra parte de la caja petri para evitar algún tipo de contaminación del vaso.

Posteriormente sacar el embudo con ayuda de la pinza de la parte de la goma, escurrir (se puede tocar embudo de la parte de la goma o tubo), colocar sobre el soporte del maniful.

Ya colocado el embudo retirar tapa de la parte del esmeril del vaso para colocar vaso sobre embudo de filtración y fijar con pinzas.

8. Repetir procedimiento del punto 7 cuantas veces sea necesario.
9. Colocar pinza para tomar membrana en un vaso de precipitados de 100ml con alcohol para dejar pinzas en él. Para ocuparlas eliminar la mayor cantidad de alcohol con golpes sobre el labio del vaso.
10. Antes de iniciar con la filtración de muestras meter un BLACO con agua estéril.
11. Rotular cajas petri.
12. Colocar con ayuda de pinzas membrana de celulosa sobre el embudo de filtración, por lo que primero hay que retirar pinza y vaso (sin dejar de sostener vaso y evitar algún tipo de contaminación de la parte esmerilada). Ya depositada la membrana colocar de nuevo vaso y pinza.
13. Repetir el paso 10 cuantas veces sean necesarias.
14. Limpiar muestra de acuerdo a:
  - Para muestras en bolsas: limpiar con gasa y alcohol, abrir y limpiar con torunda de alcohol antes de abrir.
  - Para muestras en bote y botellas: limpiar con gasa y alcohol.
  - Para latas: limpiar con gasa y alcohol, flanear tapa de la lata colocar una pequeña cantidad de alcohol sobre la tapa y encender, dejar que se consuma el alcohol. Agitar muestra vigorosamente para homogenizar muestra.
15. Abrir muestra y depositar cantidad de muestra necesaria (10ml, 100ml) en el vaso de filtración retirando la caja petri y vertiendo la muestra sobre el vaso, volver a colocar tapa, repetir operación las veces que sean necesarias.
16. Abrir válvula de paso del maniful y encender bomba de vacío.

17. Dejar que se filtre la muestra, cerrar válvula de paso del maniful y apagar bomba de vacío.
18. Retirar membrana y colocar en caja petri con medio de cultivo YEAST cuidando que no queden burbujas de aire entre el medio y la membrana.
19. Repetir los pasos 11, 14, 15 y 16 cuantas veces sea necesario para la misma muestra.
20. Enjuagar vaso y embudo de filtración con una cantidad mayor a lo filtrado de agua estéril.
21. Retirar vaso y embudo, colocar en esterilizador o lámpara UV durante 3 min.
22. Posterior al tiempo de esterilización el embudo y vaso se puede ocupar para filtrar una muestra nueva.
23. Colocar cajas petri en vaso y embudo antes de montar para evitar contaminación de los mismos y repetir pasos 11, 14, 15 y 16.
24. Las placas en que se van a determinar hongos colocarlas en bolsas de plástico para incubar (boca arriba).
25. Incubar placas de acuerdo a 36°C durante 48hrs.
26. Después del tiempo de incubación leer placas.  
Cuenta Total, contabilizar totas las colonias, si no hay crecimiento reportar como < 1 UFC/volumen filtrado, si la placa no se puede contar reportar como >100 UFC/volumen filtrado.
27. De ser necesario confirmar realizar actividad.

#### **PUNTOS CRITICOS:**

Material Estéril

Blanco al inicio de corrida con Agua estéril

No burbujas de aire entre placa y el medio de cultivo.

#### **c) VERTIDO EN PLACA**

## **1) DETERMINACION DE BACTERIAS MESOFILAS AEROBIOAS**

### **(Vertido en Placa)**

La técnica para determinación de microorganismos viable por vertido en placa, se ocupara para el conteo de microorganismos presentes en un alimento sin definir especie del mismo.

La técnica consiste en contar las colonias que desarrollen en el medio de cultivo (PCA) de acuerdo a un tiempo y temperatura de incubación.

#### **Reactivo:**

Agar Plate Count

Agar – Agar

Agua tridestilada

#### **Preparación de Medio de cultivo:**

1. De acuerdo a la cantidad de muestras a sembrar calcular la cantidad de medio a ocupar o preparar, donde cada placa lleva de 15 a 20ml de medio preparado.
2. Pesar la cantidad de agar necesario para cada determinación o medio que se requiere, de acuerdo a la especificación del fabricante del medio de cultivo.
3. Suspender la cantidad de agar pesado en la cantidad de agua necesaria de acuerdo al cálculo.

La conductividad del agua debe ser menor a  $1\mu\text{S}$ .

4. Homogenizar con la ayuda de un agitador magnético y parrilla de agitación.
5. Medir el pH de inicio el cual debe cumplir de acuerdo a instrucciones del fabricante y registrarlo en formato (Oxoid debe ser  $7.2 \pm 2$ ).
6. De acuerdo a instrucciones de fabricante colocar en calentamiento si es necesario.
7. Tapar matraz con tapa o colocar un tapón de algodón, gasa y papel aluminio.
8. Etiquetar matraz con nombre del medio de cultivo, fecha de preparación
9. Colocar cinta testigo

10. Esterilizar a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 15 min, el pH final debe ser de  $7.2 \pm 2$   
Registrar temperatura de esterilización en formato (de acuerdo al apartado de esterilización)
11. Después de esterilización dejar que enfrié y colocar en baño maría y mantenerlo a  $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  hasta que se ocupe.

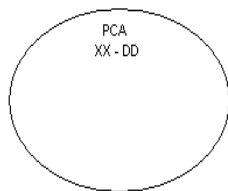
### **Preparación de la muestra:**

La muestra debe ser registrada en el formato, revisando visualmente que no tenga fugas o cuerpos extraños de ser así registrar en el apartado de observaciones.

Limpiar la muestra con gasa y alcohol, posteriormente colocar en el estantero de siembra.

### **Procedimiento de Vertido en placa:**

1. Limpiar con gasa y alcohol las superficies de la campana de flujo laminar, encender.
2. Limpiar con gasa y alcohol la bolsa de cajas petri para poder ingresar a campana.
3. Rotular las cajas petri con el nombre del medio y número de análisis.



Donde:

XX = Numero consecutivo de la lista

DD = Día en que se siembra

4. Agitar la muestra vigorosamente con movimiento de arriba hacia abajo.
5. Abrir con cuidado la muestra e inocular la caja petri previamente rotulada con 1ml de muestra.

6. Agregar aproximadamente de 15 a 20ml del medio de cultivo (PCA) y homogenizar la muestra con 6 movimientos circulares hacia la izquierda, a la derecha, arriba y abajo.
7. Dejar que solidifique el medio de cultivo ya homogenizado.
8. Sembrar un blanco o muestra testigo de una caja petri sin inocular para verificar la esterilización del medio de cultivo.
9. Posteriormente agregar una ligera capa de Agar – Agar y dejar que solidifique.

**NOTA:** no debe exceder 20min el transcurso de colocar el inóculo y el vertido del medio.

#### **Incubación:**

Las cajas deben ser incubadas de forma invertida (la tapa debe estar hacia abajo).

La temperatura de incubación es de  $35^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 48hrs  $\pm$  2hrs.

Al momento de incubar se debe colocar una etiqueta donde se coloque la fecha de entrada, fecha de salida y hora a la incubadora.

#### **Lectura:**

Contar todas las colonias que se observen y registrar en el formato como UFC/ml.

#### **PUNTOS CRITICOS:**

Medios de cultivo dentro de fecha de caducidad

Pesado de agar

Medir el volumen de agua

pH de inicio y final

Temperatura y tiempo de esterilización con blancos o muestra testigo

## **2) DETERMINACION DE COLIFORMES**



## **(Vertido en Placa)**

Técnica para determinación de buenas prácticas de manufactura en un proceso o tratamiento de alimentos. La técnica consiste en contar las colonias que desarrollen en el medio de cultivo selectivo como lo es VRBL o Agar lactosa rojo billis neutro violeta en el cual los microorganismos coliformes desarrollan en 24hrs a una temperatura de 35°C produciendo gas y ácidos orgánicos los cuales viran el indicador de pH del medio de cultivo y precipitan las sales biliares.

### **Reactivo:**

Agar lactosa rojo billis neutro violeta

Agua tridestilada

### **Preparación de Medio de cultivo:**

1. De acuerdo a la cantidad de muestras a sembrar calcular la cantidad de medio a ocupar o preparar, donde cada placa lleva de 15 a 20ml de medio preparado.
2. Pesar la cantidad de agar necesario para cada determinación o medio que se requiere, de acuerdo a la especificación del fabricante del medio de cultivo.
3. Suspender la cantidad de agar pesado en la cantidad de agua necesaria de acuerdo al cálculo.  
La conductividad del agua debe ser menor a 1 $\mu$ S.
4. Homogenizar con la ayuda de un agitador magnético en parrilla de agitación y calentamiento.
5. Medir el pH de inicio el cual debe cumplir de acuerdo a instrucciones del fabricante y registrarlo en formato M-PAC-02-04 12F (Oxoid debe ser 7.4 +/- 2).
6. Tapar matraz con tapa o colocar un tapón de algodón, gasa y papel aluminio.
7. Etiquetar matraz con nombre del medio de cultivo, fecha de preparación

8. Se deja reposar 5 min el agar sin agitación o calentamiento, posterior al tiempo se coloca matraz en parrilla de agitación y calentamiento.
9. Encender el botón de calentamiento a 200°C en la parrilla con agitación constante para que el medio se funda (de acuerdo a indicaciones del fabricante el medio de cultivo NO se esteriliza, sino se hierve).  
Se mantiene hirviendo por 5 min y se retira del fuego.
10. Se deja enfriar y en un ambiente estéril se toma muestra para revisar pH final debe ser de 7.4 +/- 2 y registrarlo en el formato.
11. Colocar en baño maría y mantenerlo a 45°C +/- 1°C hasta que se ocupe.

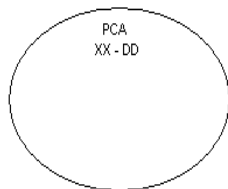
### **Preparación de la muestra:**

La muestra debe ser registrada en el formato, revisando visualmente que no tenga fugas o cuerpos extraños de ser así registrar en el apartado de observaciones.

Limpiar la muestra con gasa y alcohol, posteriormente colocar en el estantero de siembra.

### **Procedimiento de Vertido en placa:**

1. Limpiar con gasa y alcohol las superficies de la campana de flujo laminar, encender.
2. Limpiar con gasa y alcohol la bolsa de cajas petri para poder ingresar a campana.
3. Rotular las cajas petri con el nombre del medio y número de análisis.



Donde:  
XX = Numero consecutivo de la lista  
DD = Día en que se siembra

4. Agitar la muestra vigorosamente con movimiento de arriba hacia abajo.

5. Abrir con cuidado la muestra e inocular la caja petri previamente rotulada con 1ml de muestra.
6. Agregar aproximadamente de 15 a 20ml del medio de cultivo (VRBA) y homogenizar la muestra con 6 movimientos circulares hacia la izquierda, a la derecha, arriba y abajo.
7. Dejar que solidifique el medio de cultivo ya homogenizado.
8. Sembrar un blanco o muestra testigo de una caja petri sin inocular para verificar la esterilización del medio de cultivo.
9. Posteriormente agregar una segunda capa del mismo agar VRBA y dejar que solidifique.

**NOTA:** no debe exceder 20min el transcurso de colocar el inoculo y el vertido del medio.

#### **Incubación:**

Las cajas deben ser incubadas de forma invertida (la tapa debe estar hacia abajo).

La temperatura de incubación es de 35° +/- 1°C durante 24hrs +/- 2hrs.

Al momento de incubar se debe colocar una etiqueta donde se coloque la fecha de entrada, fecha de salida y hora a la incubadora.

#### **Lectura:**

Contar todas las colonias que se observen y registrar en el formato como UFC/ml.

#### **PUNTOS CRITICOS:**

Medios de cultivo dentro de fecha de caducidad

Pesado de agar

Medir el volumen de agua

pH de inicio y final

Temperatura y tiempo de esterilización con blancos o muestra testigo

### **3) DETERMINACION DE HONGOS Y LEVADURAS**

#### **(Vertido en Placa)**

Técnica para determinación el grado de contaminación de un alimento o equipo mal saneado por hongos y levaduras los cuales pueden provocar el deterioro fisicoquímico de este, debido a la utilización de carbohidratos, ácidos grasos, proteínas y lípidos en el metabolismo de hongos y levaduras provocan MAL OLOR, ALTERACIÓN EN EL SABOR, Y COLOR en la superficie del alimento.

La técnica ocupa un medio selectivo acidificado a un pH de 3.5 e incubado a 25°C ± 1 °C.

#### **Reactivo:**

- Agar papa dextrosa
- Agua tridestilada
- Acido tartárico al 10%

#### **Preparación de Medio de cultivo:**

1. De acuerdo a la cantidad de muestras a sembrar calcular la cantidad de medio a ocupar o preparar, donde cada placa lleva de 15 a 20ml de medio preparado.
2. Pesar la cantidad de agar necesario para cada determinación o medio que se requiere, de acuerdo a la especificación del fabricante del medio de cultivo.
3. Suspender la cantidad de agar pesado en la cantidad de agua necesaria de acuerdo al cálculo.

La conductividad del agua debe ser menor a 1µS.

4. Homogenizar con la ayuda de un agitador magnético en parrilla de agitación y calentamiento.

5. Medir el pH de inicio el cual debe cumplir de acuerdo a instrucciones del fabricante y registrarlo en formato.
6. Tapar matraz con tapa o colocar un tapón de algodón, gasa y papel aluminio.
7. Etiquetar matraz con nombre del medio de cultivo, fecha de preparación
8. Colocar cinta testigo
9. Esterilizar a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 15 min
10. Colocar cinta testigo
11. Esterilizar a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 15 min, el pH final debe ser de  $7.2 \pm 2$   
Registrar temperatura de esterilización en formato (de acuerdo al apartado de esterilización).
12. Después de esterilización dejar que enfrié y colocar en baño maría y mantenerlo a  $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y acidificar medio de cultivo a un pH de 3.5, agregando aproximadamente 14ml de ácido tartárico al 10% por cada 1Lt agar.

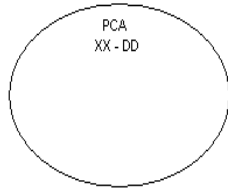
#### **Preparación de la muestra:**

La muestra debe ser registrada en el formato, revisando visualmente que no tenga fugas o cuerpos extraños de ser así registrar en el apartado de observaciones.

Limpiar la muestra con gasa y alcohol, posteriormente colocar en el estantero de siembra.

#### **Procedimiento de Vertido en placa:**

1. Limpiar con gasa y alcohol las superficies de la campana de flujo laminar, encender.
2. Limpiar con gasa y alcohol la bolsa de cajas petri para poder ingresar a campana.
3. Rotular las cajas petri con el nombre del medio y número de análisis.



Donde:

XX = Numero consecutivo de la lista

DD = Día en que se siembra

4. Agitar la muestra vigorosamente con movimiento de arriba hacia abajo.
5. Abrir con cuidado la muestra e inocular la caja petri previamente rotulada con 1ml de muestra.
6. Agregar aproximadamente de 15 a 20ml del medio de cultivo (PDA) y homogenizar la muestra con 6 movimientos circulares hacia la izquierda, a la derecha, arriba y abajo.
7. Dejar que solidifique el medio de cultivo ya homogenizado.
8. Sembrar un blanco o muestra testigo de una caja petri sin inocular para verificar la esterilización del medio de cultivo.
9. Una vez solidificado el medio en la placa colocarlas en bolsas de hule y cerrar con cinta adhesiva.

**NOTA:** no debe exceder 20min el transcurso de colocar el inculo y el vertido del medio.

#### **Incubación:**

Las bolsas con las cajas deben ser incubadas de hacia arriba.

La temperatura de incubación es de 25° +/- 1°C durante 120hrs +/- 2hrs.

Al momento de incubar se debe colocar una etiqueta donde se coloque la fecha de entrada, fecha de salida y hora a la incubadora.

#### **Lectura:**

Contar todas las colonias que se observen y registrar en el formato M-PAC-02-04 F13 como UFC/ml.

Hongos: está constituida por un cuerpo filamentosos con ramificaciones y las LEVADURAS son formas unicelulares.

#### **PUNTOS CRITICOS:**

Medios de cultivo dentro de fecha de caducidad

Pesado de agar

Medir el volumen de agua

pH de inicio y final

Temperatura y tiempo de esterilización con blancos o muestra testigo

#### **4) SIEMBRA DE FROTIS SUPERFICIES VIVAS O INERTES**

Los hisopos son estriados de forma masiva sobre la placa con agar para el medio para el microorganismo que se va a determinar.

#### **8.5 INCUBACION**

Teniendo las placas (micro filtración o vertido en placa) colocarse en la incubadora que corresponda y durante el tiempo siguiente:

- Incubar muestras para coliformes por 24 horas (1día) a una temperatura de 95°F (35°C).
- Incubar muestras para cuenta total por 48 horas (2 días) a 95°F (35°C)
- Incubar muestras para hongos y levaduras por 120 horas (5 días) a 86°F (25°C).  
Observa las muestras cuando tengan 48 horas. Si la membrana presenta crecimientos esparcidos cuéntelos inmediatamente, de otra manera espere el resto de horas para cuantificar las colonias.

## 8.6 CONTEO DE COLONIAS

Después de la incubación se cuentan las colonias desarrolladas en las placas cuando se leen placas de diluciones se multiplican por la inversa de la dilución que corresponda a la placa contada. Esto permite estimar el número de microorganismos viables por gramo o mililitro.

- a) Para el conteo de coliformes en Endo, solo se cuentan aquellas colonias que tienen un brillo metálico color oro o verde, descarte cualquier otra colonia de color rosa o roja que no tenga ese brillo. Para el conteo de coliformes por el método vertido de placa se toman en cuenta todas aquellas colonias de color rosa deslavado (como borrositas).
- b) Para el conteo de cuenta total Standard TTC cuente aquellas colonias de color rojo y/o rosado. Para el conteo de cuenta total en vertido de placa se considera el crecimiento de todas las bacterias exceptuando a los Hongos y levaduras.
- c) Para el conteo de hongos y levaduras, se cuenta cualquier hongo presente, las colonias de hongos se caracterizan por tener una apariencia aterciopelada o filamentosa, y por sus colores. Las colonias de levaduras son por lo regular de color blanco o crema, aunque algunas pueden ser de color azul o verde, porque absorben la coloración del medio y tiene un olor a pan recién horneado. Las colonias de bacterias son más pequeñas que las colonias de levaduras y son transparentes con forma irregular. Esto aplica para los dos métodos.

El resultado de la siembra de las muestras control, debe ser cero, si se encuentra 1 o más de 2 UFC los resultados no tiene una validez oficial, y la prueba tiene que repetirse.

Si los resultados son correctos deberán ser estimados, para estimar cuenta 10 rejillas representativas y los resultados de esas 10 rejillas multiplíquelos por 150, Si



obtenemos un resultado de 300 bacterias tal vez sean incorrectos debido a la sobrepoblación en la membrana, si obtenemos un resultado de 100 también puede ser incorrecto y las colonias pueden ser más largas, si existe un crecimiento esparcido no se puede contar con exactitud lo que se hace es que se divide la placa en 4 recuadros contar solo un recuadro y tratar de contar la mayor cantidad de colonias, el resultado se multiplica por cuatro y finalmente se divide entre la cantidad de mililitros utilizados ya sea 5 o 20 y el resultado se reporta como UFC / ml.

## **8.7 AREA DE TRABAJO.**

Un cuidado detallado, es esencial para una exitosa prueba de microbiología. Los siguientes pasos preliminares deben seguirse en orden para minimizar los riesgos de contaminación.

1. Asegúrese de que el acceso a las salidas es fácil y completamente visible, para conectar una campana de flujo laminar, y conectar el equipo necesario, lo ideal es que haya un cuarto separado (exclusivamente para realizar las pruebas microbiológicas), con luz adecuada, contactos eléctricos, y un flujo de aire positivo con filtros Hepa.
2. Asegúrese de que el aire que entra al abrir o cerrar la puerta sea el menor posible para reducir el riesgo de levantar polvo de los estantes y lugares similares, asegúrese de que los ventiladores o sistema de aire acondicionado no estén soplando directamente sobre el área de trabajo, en algunos casos es necesario apagarlos por el tiempo que duren las pruebas.
3. La superficie del área de trabajo debe estar totalmente limpia y sanitizada, se puede sanitizar con solo pasar una franela o toallita con alcohol.
4. El analista debe lavarse las manos hasta el antebrazo con agua caliente y jabón antes de comenzar el trabajo de microbiología y limpiarse las manos periódicamente con alcohol durante el tiempo que duren las pruebas.
5. Las mangas deben ser cortas o se deben enredar hacia arriba para evitar contaminar el equipo esterilizado por un contacto inadvertido.

6. El analista debe evitar estornudar, toser o exhalar directamente o sobre el equipo esterilizado.

#### **8.7.1 CONTROL DE PLACAS.**

Para cada serie de pruebas de microbiología, debe utilizarse un control o blanco por cada corrida o siembra. Esto permite un monitoreo del equipo, agua esterilizada, y los métodos utilizados. Los controles verifican que las cuentas obtenidas sean lo más exactas posible; estos controles nos indican un problema de contaminación de la muestra, por lo cual la prueba tiene que ser repetida.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Plan de Autocontrol de Laboratorio de Microbiología de Alimentos

N o.	Área	Punto Crítico	Medición	Frecuencia	Especificación	Criterio de Aceptación	Acciones a seguir
1	Reactivos	Entrega de Agares y Reactivos con Certificado de Calidad	Calidad (Lote, fecha de caducidad)	Cada Recepción	NA	Se rechaza si no cuenta con Certificado de Calidad o está caduco	No se recibe material, se envía correo a área de compras
2		Inventario de Agares y Reactivos	Dentro de caducidad	Mensual	NA	Dentro de fecha de caducidad	Se da de baja en el inventario y se desecha
3		Almacenamiento de reactivos de acuerdo a rombo de seguridad	Separación de acuerdo a severidad	Cada Recepción	NA	Rechazo	Se da de alta una no conformidad dentro de evaluación de BPL
4		Evaluación de BPL	Almacenamiento	Mensual	NA	Rechazo: mal almacenamiento	Se da de alta una no conformidad dentro de evaluación de BPL
5	Equipos	Equipos en listado de equipos	NA	Ingreso de nuevos equipos	NA	No conformidad	Aviso a Metrólogo, se da de alta en listado interno de laboratorio, programa de calibración.
6	Equipos	Calibración de equipos	Temperatura Presión Intensidad pH	Anual	De acuerdo a procedimientos	Dentro de especificación	Ajuste de equipo, calibración o reemplazo de equipo
7		Verificación de	Temperatura	Diaria	De acuerdo a equipo	Rechazo: temperatura	Se ajusta temperatura

		temperatura en incubadoras				fuera de especificación	ra programada en set point
8		Verificación de temperatura de refrigeradores					
9		Verificación de temperatura en baño maría					
10		Verificación de temperatura del proceso de esterilización en autoclave		En cada esterilización	121 °C durante 15 minutos		Ajuste para alcanzar las condiciones establecidas.
11		Esterilizador UV	Horas trabajadas	Cada que se utilice el equipo	Máximo 10000 hr trabajadas	Horas trabajadas de acuerdo a especificación	Cambio de lámparas
12		Filtro EPA de campana de flujo laminar	Análisis microbiológico o de medio ambiente	Cada 3 meses	<10UFC/placa	Rechazo: Fuera de especificación	Cambio de filtro EPA
13		Pre-filtro de campana de flujo laminar	Análisis visual	Cada 3 meses	Debe encontrarse limpio	Rechazo: sucio	Cambio de pre-filtro
14		Verificación de medidor de pH	pH	Diaria	pH 3.8-4.2 pH 6.8-7.2	Rechazo: fuera de rango	Ajuste de pH o calibración externa.
15	Limpieza	Limpieza de incubadoras	Limpieza	Quincenal	NA	Rechazo: sucio, con derrame de líquidos o agar	Limpieza con solución clorada al 0.2%, posterior limpieza con gasa y alcohol al 70%
16	Limpieza	Limpieza de Refrigeradores	Limpieza	Quincenal	NA	Rechazo: sucio, con derrame de líquidos o agar	Limpieza con solución clorada al 0.2%, posterior limpieza

							con gasa y alcohol al 70%
17		Cambio de agua de baño maría		Cada tercer día	NA	Rechazo: agua sucia	Limpieza con jabón neutro y cloro al 0.2%
18		Limpieza de pisos de laboratorio		Diaria	NA	Rechazo: superficie sucia	Agua clorada al 0.2%
19		Limpieza de muros de laboratorio		Quincenal	NA		
20		Lavado de material		Cada que se utilice	NA	Rechazo: material sucio	Lavado con jabón neutro al 2% ó al 5% para material pegado
21		Botes con caldos para <i>Salmonella</i>	Inactivar	Cada que se utilice	NA	Rechazo: sucio, con derrame	Solución clorada al 10% durante 1 hr
22	Personal	Capacitación en técnicas y equipos de laboratorio	Capacitación	Cada ingreso	NA	NA	No puede realizar técnicas sin capacitación
23		Evaluación de repetibilidad de resultados por analista	Evaluación	Anual	NA	Rechazo: resultados con diferencia de 5 UFC.	Realizar acción correctiva
24		Evaluación de aplicación de técnicas.	Evaluación	Anual	De acuerdo a manual	Rechazo: no seguir técnicas	Realizar acción correctiva
25	Materiales	Agua tridestilada	Análisis microbiológico	Por lote	< 10 UFC/100ml	Rechazo: >10 UFC/100ml	Rechazo de material
26		Cajas Petri		Por lote			
27		Medios de cultivo		Por lote			
28	Siembra	Blanco de agua tridestilada	Análisis microbiológico	Por lote	<10 UFC/100ml	Rechazo: >10 UFC/100ml	Rechazo de lote
29		Blanco de medio de cultivo		Por lote	<1UFC/placa	Rechazo: >1UFC/placa	Rechazo de lote
30		Blanco prueba esterilidad		Semanal	Indicador biológico	Rechazo: no presentar vire a color amarillo	Rechazo de lote

## 9.2 Estandarización de preparación de medios de cultivo

Determinación	Marc a	Nombre	pHi/pHf	Cantidad a pesar/litro	A	S	E
Cuenta total	MER K	Plate Count Agar	7.2±0.2	22.5g	-	-	Si
	OXOID	Plate Count Agar	7.2±0.2	24 g	-	-	Si
Coliformes	OXOID	Yeast Extract Agar	7.2±0.2	23 g	-	-	Si
	MER K	Tergitol 7	7.2±0.2	53.9 g	-	TTC-50ml (D/E)	Si
	BIOXON	Caldo Verde Bilis Brillante	7.2±0.2	40 g	-	-	Si
	OXOID	Rojo Bilis Violeta Agar	7.4±0.2	38.5 g	-	-	No
Pseudomona	OXOID	Tergitol 7	7.2±0.2	54.15 g	-	TTC-50ml (D/E)	Si
	DIFCO	Agar Cetramida	7.2±0.2	45.3 g	10 g caseína, 0.012 5g Ác. Nalídico, 10g Glicerol (A/E)	-	Si
	OXOID	Agar base Pseudomona	7.2±0.2	48.4g	-	2 fcos SR0103E L (D/E)	Si
Hongos y levaduras	BIOXON	Agar Papa Dextrosa	5.5±0.2/3.5±0.1*	39 g	-	Ác. Tartárico 10%-14ml (D/E)	Si
	MER K	YGC	6.6±0.2/3.5±0.1*	40 g	-	HCl-34ml/100 ml (D/E)	Si
Hongos, levaduras y BAL	OXOID	Oxitetracilina+Glucosa+Yeast Extract Agar	7.0±0.2	37g	-	2fcos. JR0073A (D/E)	Si
	OXOID	Yeast Mould Agar	7.0±0.2	40g	-	-	Si
	BIOXON	Naranja Suero Agar	5.5±0.2/3.5±0.1*	37g	-	HCl-9ml/Ln(D/E)	Si
	OXOID	OSA	5.5±0.2/3.5±	45g	-	HCl-9ml/L	Si

	D		0.1*			(D/E)	
Lactobacilos	3M	Peptona	7.0±0.2	20g	-		Si
	3M	Caldo MRS (2X)	6.2±0.2	52.3g	-		Si
Dilución (NOM)	BIOXON	Peptona de caseína	7.0±0.2	1g	8.5g NaCl (A/E)	-	Si
Suplemento	MERK	Ác. Tartárico 10%	-	10g	-	-	Si
	FERMONT	KOH 3%	-	3g/100ml	-	-	Si
	MERK	TTC 0.05%	-	0.05g/100 ml	-	-	Si
	MERK	Solución Ringer	7.0±0.2	2 tabletas	-	-	Si
	OXOID	Kliger Iron	7.4±0.2	55g	-	-	Si
	OXOID	Agar Nutritivo	7.4±0.2	28g	-	-	Si
	HYCEL	Agar Agar	-	20g	-	-	Si

#### Abreviaturas:

g= gramos

A/E= antes de esterilizar

D/E= después de esterilizar

\*x/x= pH inicial/ pH final

A= aditivos

S= suplementos

E= esterilización

### 9.3 Información para preparación de medios de cultivo

FECHA DE PREPARACIÓN	MEDIO A PREPARAR	LOT E	CADUCIDA D	CANTIDAD PESADA DE MEDIO	CANTIDAD PESADA DE ADITIVOS	TEMP. ESTERILIZACIÓN	CANTIDAD ADICIONADA DE ADITIVOS DESPUÉS DE ESTERILIZACIÓN	pH INICIAL	pH FINAL	TEMP. DEL MEDIO	NOMBRE DE QUIEN PREPARA	CINTA TESTIGO	CONTROL NEGATIVO	CONDUCTIVIDAD DEL AGUA

**Cinta testigo:** (-) no cambio de color; (+) cambio de color ; **Control negativo:** <1 sin crecimiento; >1 crecimiento



## 9.4 Listado de reactivos, soluciones y consumibles

Listado de Reactivos, Soluciones y Consumibles										Código	No. Rev.	1	
Responsable	Área / Depto	Proceso	Microbiología	Subproc	Microbiología	Página							
Familia:		Reactivos Agares											
No	Clave	Nombre del reactivo	Cod. SAMI	Fecha Ingreso	Marca	Lote	Cantidad	Unidades	Contenido	Unidades	Caducidad	Cond. Almacenamiento	Observacion
1	R-AG-MB-01	Water Plate Couutt Agar	AUXVA4985	05/06/2013	OXOID	1310220	4		500 gr		Feb-18	10-30°C	
2	R-AG-MB-02	Water Plate Couutt Agar	AUXVA4985	22/10/13	OXOID	1280122	1		500 gr		Feb-18	10-30°C	
3	R-AG-MB-03	Plate Count Agar	AUXVA4985		MERCK	VM193563	4		500 gr		#####	15-25°C	
4	R-AG-MB-04	Videt Red Bile Agar	AUXVA5047	04/01/2013	OXOID	1230587	4		500 gr		Ago-17	10-30°C	
5	R-AG-MB-05	Tergitol-7 Agar	AUXVA0068	22/10/13	OXOID	1162039	1		500 gr			10-30°C	
6	R-AG-MB-06	Yeast and Mould Agar	AUXVA1682	04/01/2013	OXOID	1073624	1		500 gr		Ago-16	10-30°C	
7	R-AG-MB-07	Oxytetracycline-Glucose Yeast Agar	AUXVA0612	21/10/13	OXOID	1177495	1		500 gr		Abr-17	10-30°C	
8	R-AG-MB-08	Oxytetracycline-Glucose Yeast Agar	AUXVA0612	22/10/13	OXOID	1177495	2		500gr		Abr-17	10-30°C	
9	R-AG-MB-09	Potato Dextrose Agar	AUXVA5044	04/01/2013	OXOID	1238955	5		500 gr		Sep-17	10-30°C	
10	R-AG-MB-10	Orange Serum Agar	AUXVA5045	04/01/2013	OXOID	1232438	2		500 gr		Ago-17	10-30°C	
11	R-AG-MB-11	Orange Serum Agar	AUXVA5045	04/01/2013	OXOID	1224636	5		500 gr		Ago-17	10-30°C	
12	R-AG-MB-12	Orange Serum Agar	AUXVA5045	02/01/2013	BD	2156484	1		500 gr		Abr-16	2-25°C	
13	R-AG-MB-13	Caldo Agua de Peptona Amortiguada	PAPVA1665	13-Jun	3M	2017-02-AK	1		500 gr		Feb-17	2-30°C	
14	R-AG-MB-14	Peptona	AUXVA0560		HYCEL	268429	2		500 gr			15-30°C	
15	R-AG-MB-15	Peptona de caseina	AUXVA0560		BD BIOXON	2228489	1		300 gr		May-14	2-30°C	
16	R-AG-MB-16	M.Y.P. Agar Base	PAPVA1677	05/06/2013	OXOID	1216565	1		500 gr		Jul-17	10-30°C	
17	R-AG-MB-17	M.Y.P. Agar Base	PAPVA1677	27/06/13	OXOID	1216565	2		500 gr		Jul-17	10-30°C	
18	R-AG-MB-18	X.L.D. Medium	PAPVA1673		OXOID	856447	2		500 gr		Ago-14	10-30°C	
19	R-AG-MB-19	X.L.D. Medium	PAPVA1673	05/06/2013	OXOID	1326586	1		500 gr		Abr-16	10-30°C	
20	R-AG-MB-20	X.L.D. Medium	PAPVA1673	27/06/13	OXOID	1326587	1		500 gr		Abr-16	10-30°C	
21	R-AG-MB-21	Pseudomonas agar base	AUXVA0616	09/06/2013	OXOID	1259648	1		500 gr		Oct-17	10-30°C	
22	R-AG-MB-22	Pseudomonas cetrimide agar	AUXVA5142	13/01/14	OXOID	1153637	2		500 gr			10-30°C	
23	R-AG-MB-23	Tetrathionate Broth Base	PAPVA1671	04/01/2013	OXOID	846991	2		500 gr		Dic-14	10-30°C	
24	R-AG-MB-24	Selenite cystine Broth Base	PAPVA1678	30/5/2013	OXOID	1095189	1		500 gr		Sep-16	10-30°C	
25	R-AG-MB-25	S.s agar (salmonella, shigella agar)	PAPVA1674	04/01/2013	OXOID	1283556	2		500 gr		Dic-17	10-30°C	
26	R-AG-MB-26	S.s agar (salmonella, shigella agar)	PAPVA1674	31/7/2013	OXOID	1283556	2		500 gr		Dic-17	10-30°C	
27	R-AG-MB-27	Brilliant Green Agar	AUXVA2662	26/06/13	OXOID	1188786	2		500 gr		May-17	10-30°C	
28	R-AG-MB-28	Lactose Broth	PAPVA1670	31/07/13	OXOID	1141456	2		500 gr		Ene-17	10-30°C	
29	R-AG-MB-29	Lactose Broth	PAPVA1670	17/10/13	OXOID	1141456	1		500 gr		Ene-17	10-30°C	
30	R-AG-MB-30	d-Tartaric Acid Crystal	AUXVA0052	02/01/2013	J.T. Baker	0386-01	1		500 gr			25°C	
31	R-AG-MB-31	Solucion Verde brillante 1%		08/02/2013	COTT								
32	R-AG-MB-32	Verde Brillante	AUXVA2662	25/06/13	Mercurio	41208	1						

Familia:		Reactivos Verde											
No	Clave	Nombre del reactivo	Cod. SAMI	Fecha Ingreso	Marca	Lote	Cantidad	Unidades	Contenido	Unidades	Caducidad	Cond. Almacenamiento	Observacion
34	R-VD-MB-34	Caldo Verde Brillante Bilis 15%	AUXVA5049		BD BIOXON	2146215	1		450 gr		Nov-16	2-30°C	
35	R-VD-MB-35	Triple Sugar Iron Agar	PAPVA1675	04/01/2013	OXOID	748010	3		500 gr		Feb-14	10-30°C	
36	R-VD-MB-36	Lysine Iron Agar	PAPVA1676	04/01/2013	OXOID	844518	3		500 gr		Dic-14	10-30°C	
37	R-VD-MB-37	Sodium Thiosulfate 5-Hydrate, Cristal	AUXVA5043	02/01/2013	J.T. Baker	394601	2		500 gr				
38	R-VD-MB-38	Agar - Agar	AUXVA5042		MERCK	VM203514	1		1 kg		Nov-13	15-25°C	
39	R-VD-MB-39	YGC- Agar	4VAR0135		MERCK	VM035900	1		500 gr		Ene-14	25°C	
40	R-VD-MB-40	Agar- Agar	AUXVA5042		HYCEL	254664	1		25 gr			15-30°C	
41	R-VD-MB-41	Disolución Patrón pH 6.86	AUXVA1028		FERMONT	252341	1		1 L			25°C	

Familia:		Reactivos Azul											
No	Clave	Nombre del reactivo	Cod. SAMI	Fecha Ingreso	Marca	Lote	Cantidad	Unidades	Contenido	Unidades	Caducidad	Cond. Almacenamiento	Observacion
43	R-AZ-MB-43	Cloruro de sodio	AUXIL0175		Mercurio	180412	3		1 kg				
44	R-AZ-MB-44	Yoduro de Potasio	AUXVA0273		Mercurio	50612	1		100 gr		Oct-17		
45	R-AZ-MB-45	Cristal Violeta	AUXVA5059		HYCEL	262595	1		1 L			15-30°C	
46	R-AZ-MB-46	Yodo lugol concentrado	AUXVA5060		HYCEL	267680	1		1 L			15-30°C	
47	R-AZ-MB-47	Safranina	AUXVA5052		HYCEL	274568	1		1 L			15-30°C	
48	R-AZ-MB-48	Glicerina	AUXVA1001		Mercurio	270612	1		1 L			25°C	
49	R-AZ-MB-49	Hidroxido de Sodio	AUXVA1820		Mercurio	61008	1		500 gr			25°C	

Familia:		Reactivos Rojos											
No	Clave	Nombre del reactivo	Cod. SAMI	Fecha Ingreso	Marca	Lote	Cantidad	Unidades	Contenido	Unidades	Caducidad	Cond. Almacenamiento	Observacion
50	R-RJ-MB-50	Alcohol etilico	AUXVA0125		J.T. Baker		1		1 L				
51	R-RJ-MB-51	Yodo-Yoduro		23/06/13	COTT		1				23/01/14		
52	R-RJ-MB-52	Alcohol acetona			Mercurio	30412	1						
53	R-RJ-MB-53	2,3,5- Triphenyltetrazolium	AUXVA5991		MERCK	UN1325	1		100 gr		28/02/14	5-30°C	
54	R-RJ-MB-54	Acido clorhidrico	AUXVA5025		Mercurio	1011	1		1 L				
55	R-RJ-MB-55	HCL 37%											
56	R-RJ-MB-56	Nalidixic acid		02/01/2013	Sigma Aldrich	078K0712	1		25 gr			25°C	
57	R-RJ-MB-57	Aceite para inmersión	AUXVA5071		HYCEL	273508	3		100 ml			15-30°C	

Familia:		Reactivo Blanco											
No	Clave	Nombre del reactivo	Cod. SAMI	Fecha Ingreso	Marca	Lote	Cantidad	Unidades	Contenido	Unidades	Caducidad	Cond. Almacenamiento	Observacion
58	R-BL-MB-58	Buffer Solution Borate pH 10	AUXVA9602	01/02/2014	J.T. Baker	M11C30	1		1 L			25°C	
59	R-BL-MB-59	Buffer Solution Biphthalate pH 4	AUXVA0435	01/02/2014	J.T. Baker	M12C14	1		1 L			25°C	
60	R-BL-MB-60	Buffer Solution Phosphate pH 7	AUXVA9601	01/02/2014	J.T. Baker	M10C36	1		1 L			25°C	
61	R-BL-MB-61	Hidroxido de Potasio	AUXVA0247		FERMONT	23102	1		500 gr			25°C	
62	R-BL-MB-62	Hidroxido de Sodio	AUXVA0281		Mercurio	60111	1		1 L			25°C	
63	R-BL-MB-63	Reactivo para determinacion BIOXAN TFM 1			SANOX	AS1090413	1				Abril 2014		
64	R-BL-MB-64	Reactivo para determinacion BIOXAN TFM 2			SANOX	YP2180613	1				Abril 2014		
65	R-BL-MB-65	Reactivo para determinacion BIOXAN TFM 3			SANOX	CO220413	1				Abril 2014		
66	R-BL-MB-66	Reactivo para determinacion BIOXAN TFM 4			SANOX	AL1190413	1				Abril 2014		
67	R-BL-MB-67	Reactivo para determinacion BIOXAN TFM 5			SANOX	TS2230413	1				Abril 2014		
Familia:		Reactivos Amarillo											
No	Clave	Nombre del reactivo	Cod. SAMI	Fecha Ingreso	Marca	Lote	Cantidad	Unidades	Contenido	Unidades	Caducidad	Cond. Almacenamiento	Observacion
68	R-AM-MB-68	Tabletas de RINGER			MERCK	TP998325	1		100 tabs			25°C	
69	R-AM-MB-69	Peroxido de Hidrogeno	AUXVA5063		Mercurio	80612	1		1 L				
70	R-AM-MB-70	Sodium bisulfite	AUXVA2661		Sigma Aldrich	MKBF4098V	1		500 gr			25°C	
71	R-AM-MB-71	Yodo			Mercurio	240912	1		100 gr		Sep-15	25°C	
72	R-AM-MB-72	Rappaport- Vassiliadis	PAPVA1672		OXOID	1331181	3		500 gr		Abr-14	10-30°C	









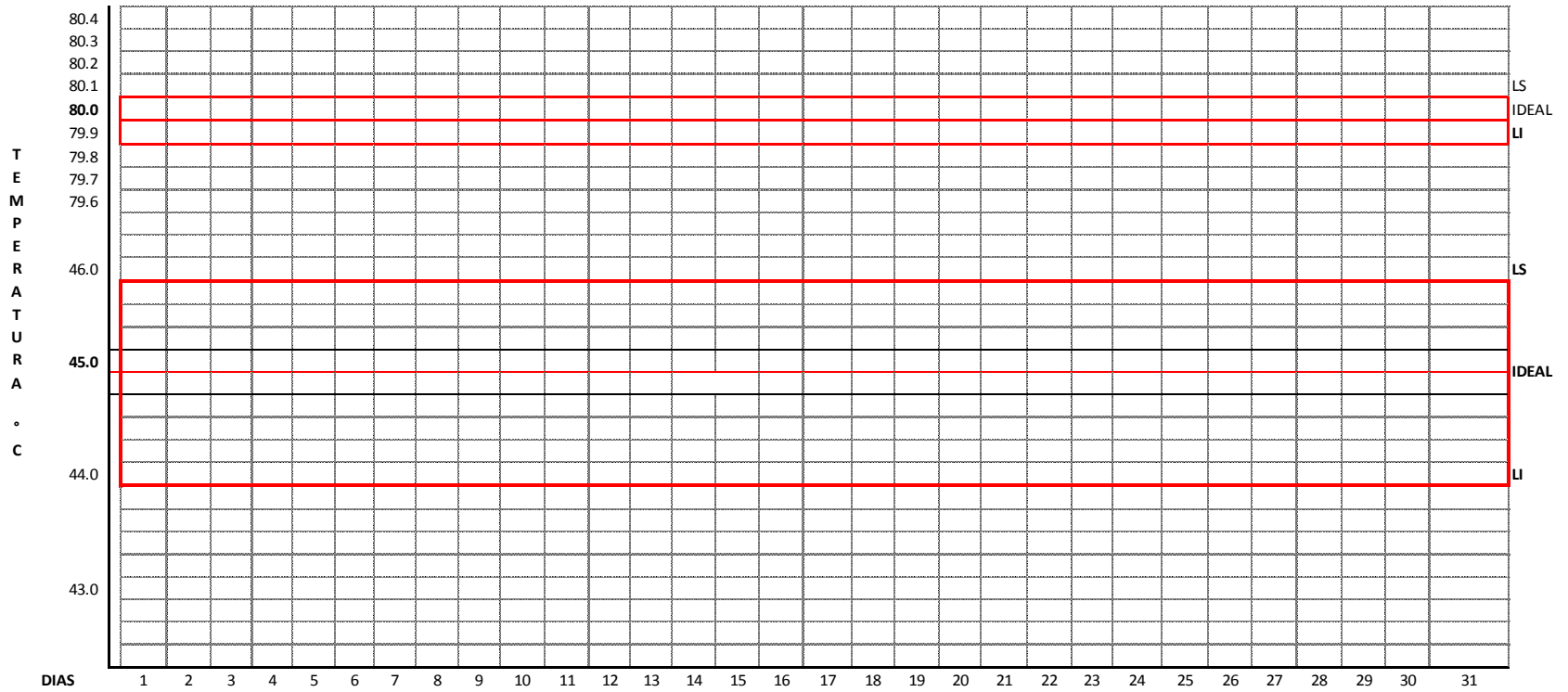






RANGO DE ESPECIFICACIÓN	45°C +/- 0.5°C
MES	
Codigo: M-PAC-02-04-F14	

### REGISTRO DE TEMPERATURA DEL BAÑO MARIA



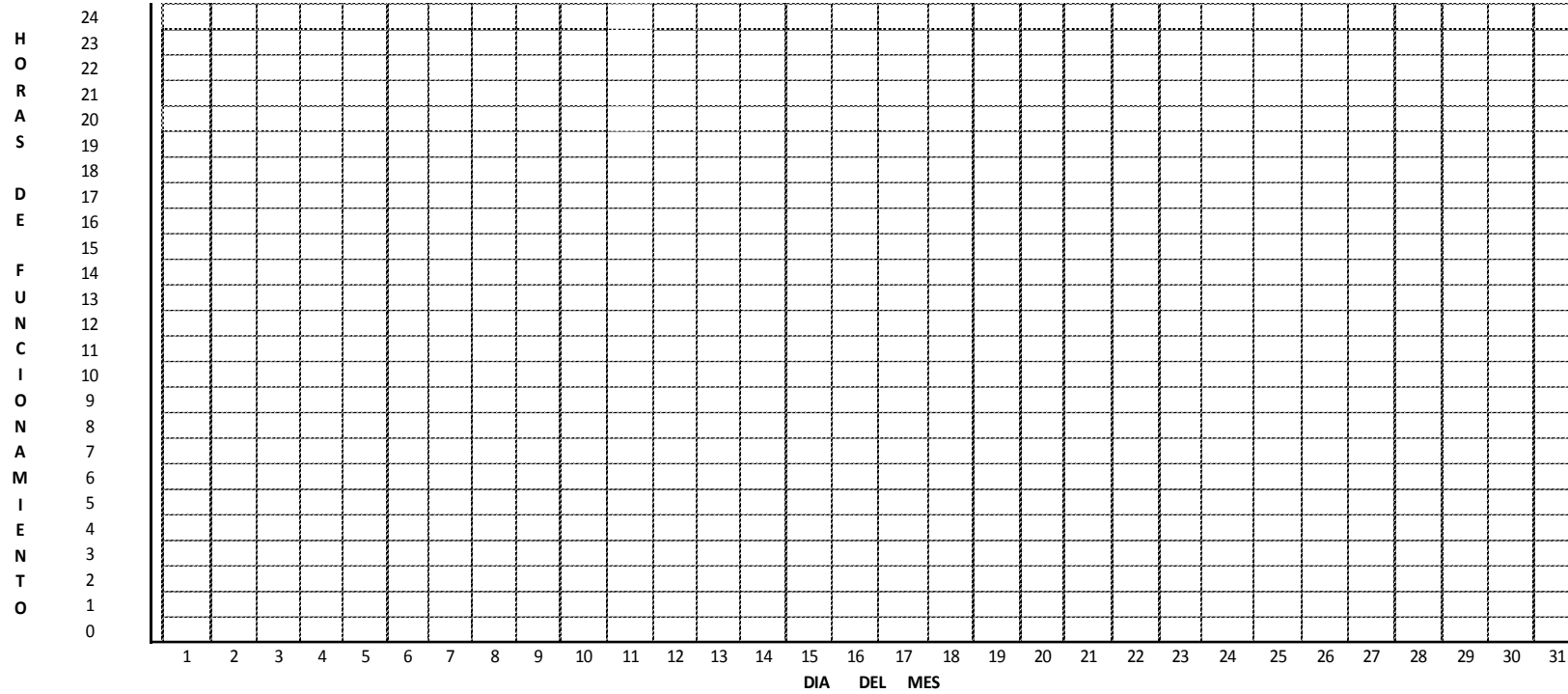
NOMBRE (QUIEN REALIZA LA LECTURA)																															



MES

Abr-13

VIDA UTIL DE LAMPARA UV



NOMBRE DEL USUARIO

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

## 9.6 Programa de calibración

### PROGRAMA DE CALIBRACION EXTERNA DE EQUIPOS 2013 - 2014 MICROBIOLOGIA

Responsable	Departamento	Proceso	METROLOGÍA	Subproceso	CALIBRACIÓN EXTERNA	0
EQUIPO	CLAVE	UBICACIÓN	MAGNITUD	ALCANCE	FRECUENCIA	HA DE CALIBR
TERMOMETRO DE MERCURIO	ETM-MB-001	LABORATORIO DE MIC	TEMPERATURA			10/01/2014
TERMOMETRO DE MERCURIO	ETM-MB-002	LABORATORIO DE MIC	TEMPERATURA			10/01/2014
TERMOMETRO DE MERCURIO	ETM-MB-003	LABORATORIO DE MIC	TEMPERATURA			10/01/2014
TERMOMETRO DE MERCURIO	ETM-MB-004	LABORATORIO DE MIC	TEMPERATURA			10/01/2014
INCUBADORA " BB "	ETM-MB-008	LABORATORIO DE MIC	TEMPERATURA			17/05/2013
INCUBADORA " CC "	ETM-MB-009	LABORATORIO DE MIC	TEMPERATURA			26/06/2013
INCUBADORA " AA "	ETM-MB-010	LABORATORIO DE MIC	TEMPERATURA			17/05/2013
TERMOMETRO DE MERCURIO	ETM-MB-011	LABORATORIO DE MIC	TEMPERATURA			22/03/2013
BALANZA GRANATARIA	EMS-MB-001	LABORATORIO DE MIC	MASA			10/12/2013
POTENCIOMETRO MEDIDOR DE PH	EPH-MB001	LABORATORIO DE MIC	PH			20/02/2013
EQUIPO DE LAMPARAS UV MILIPORE	EIL-MB-001	LABORATORIO DE MIC	TENSIDAD LUMINOS			
MANOMETRO DE PRESION BOMBA DE VACIO	EPR-MB-004	LABORATORIO DE MIC	PRESION			05/12/2012
VACUOMETRO BOMBA DE VACIO	EPR-MB-005	LABORATORIO DE MIC	PRESION			05/12/2012

TERMOMETRO DE MERCURIO	ETM-MB-013	LABORATORIO DE MIC	TEMPERATURA			20/06/2013
TERMOMETRO DE MERCURIO	ETM-MB-014	LABORATORIO DE MIC	TEMPERATURA			20/06/2013
INCUBADORA	ETM-MB-015	LABORATORIO DE MIC	TEMPERATURA			17/05/2013
INCUBADORA	ETM-MB-016	LABORATORIO DE MIC	TEMPERATURA			17/05/2013
INCUBADORA	ETM-MB-017	LABORATORIO DE MIC	TEMPERATURA			17/05/2013
INCUBADORA	ETM-MB-018	LABORATORIO DE MIC	TEMPERATURA			17/05/2013
BALANZA ANALITICA	EMS-MB-002	LABORATORIO DE MIC	MASA			12/02/2014
REFRIGERADOR	ETM-MB-019	LABORATORIO DE MIC	TEMPERATURA			26/06/2013
REFRIGERADOR	ETM-MB-020	LABORATORIO DE MIC	TEMPERATURA			26/06/2013
INCUBADORA "D"	ETM-MB-022	LABORATORIO DE MIC	TEMPERATURA			26/06/2013
MICROPIPETA	EVL-MB-001	LABORATORIO DE MIC	VOLUMEN			16/01/2014
MICROPIPETA	EVL-MB-002	LABORATORIO DE MIC	VOLUMEN			16/01/2014
BAÑO LÍQUIDO DE TEMPERATURA	ETM-MB-023	LABORATORIO DE MIC	TEMPERATURA			22/11/2013
AUTOCLAVE	ETM-MB-024	LABORATORIO DE MIC	TEMPERATURA			
VALVULA DE PRESION AUTOCLAVE	EPR-MB-006	LABORATORIO DE MIC	PRESION			
MANOMETRO DE PRESION AUTOCLAVE	EPR-MB-007	LABORATORIO DE MIC	PRESION			24/01/2014
CAMPANA DE FLUJO LUMINAR	EMTTO-MB-001	LABORATORIO DE MIC	VOLUMEN			08/03/2013

CONTADOR DE UFC CONTADOR DE COLONIAS		LABORATORIO DE MIC				
MICROSCOPIO	ELN-MB-001	LABORATORIO DE MIC	VOLUMEN			
MEDIDOR DE FLUJO DE AIRE	ECC-PJ-001	LABORATORIO DE MIC	VOLUMEN			

	Servicio realizado
	Servicio programado
	servicio reprogramado
	Verificar su calibración