

N.F. LIGHTFOOT y E.A. MAIER
Editores



ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS Y AGUAS

**DIRECTRICES PARA EL ASEGURAMIENTO
DE LA CALIDAD**



Editorial ACRIBIA, S.A.

Institut
Pasteur
de Lille



Análisis microbiológico de alimentos y aguas

Directrices para el aseguramiento de la calidad

Editores

N. F. LIGHTFOOT

*Public Health Laboratory Service
Newcastle upon Tyne
U.K.*

E. A. MAIER

*European Commission
DG XII Measurement and Testing Programme
Brussels
Belgium*

**Editorial ACRIBIA, S.A.
ZARAGOZA (España)**

Índice

<i>Prólogo a la edición española 2002</i>	v
<i>Introducción</i>	vii
<i>Lista de colaboradores</i>	xi
<i>Capítulo 1. Objeto y campo de aplicación</i>	1
1.1. Introducción	1
1.2. Consecuencias de resultados incorrectos	1
1.3. Aseguramiento de la calidad	2
1.4. Tipos de laboratorios	4
1.5. Elementos de un programa de aseguramiento de la calidad	4
1.6. Acreditación	6
1.7. Beneficios de un programa de aseguramiento de la calidad	7
Bibliografía	7
<i>Capítulo 2. Implantación de un programa de aseguramiento de la calidad</i>	9
2.1. Introducción	9
2.2. Personal (ver Capítulo 3)	10
2.3. Medios de cultivo (Ver Capítulo 6)	10
2.4. Métodos (ver Capítulo 7)	11
2.5. Equipos (ver Capítulo 5)	12
2.6. Tratamiento de muestras (ver Capítulo 4)	12
2.7. Tratamiento de datos (ver Capítulo 9)	13
2.8. Sistemas de control de la calidad (ver Capítulo 8)	13
2.9. Seguimiento	16
Bibliografía	17

Capítulo 3. Personal, gestión y organización	19
3.1. Introducción	19
3.2. Personal	20
3.2.1. Gestión	20
3.2.2. Cualificación del personal	20
3.2.3. Formación	22
3.3. Distribución del laboratorio y condiciones ambientales	24
3.4. Seguridad	26
3.5. Procedimientos de trabajo	27
3.6. Comunicación y relación con los clientes	28
3.7. Gestión de reclamaciones	29
Bibliografía	29
Otras fuentes de información	29
Capítulo 4. Toma de muestras	31
4.1. Introducción	31
4.2. Distribución de los organismos en los alimentos y el agua	33
4.3. Planes para la toma de muestras	34
4.4. Alimentos	35
4.4.1. Control de aceptación/rechazo	35
4.4.2. Control de producto final	35
4.4.3. Análisis de tendencia	35
4.4.4. Control oficial	36
4.4.5. Toma de muestras para investigación	36
4.4.6. Estudio de brotes	37
4.4.7. Control ambiental y sanitario	37
4.4.8. Transporte de las muestras de alimentos	37
4.4.9. Conservación temporal de muestras de alimentos	39
4.5. Agua	39
4.5.1. Control de aguas naturales para actividades recreativas	40
4.5.2. Control del agua de bebida	41
4.5.3. Control del agua embotellada	42
4.5.4. Control de piscinas	43
4.6. Registro de muestras	43
4.7. Formación del personal para la toma de muestras	43
4.8. Transporte de muestras	44
4.9. Recepción de muestras	44
4.10. Resumen	45
Bibliografía	45
Capítulo 5. Equipos	47
5.1. Introducción	47
5.2. Tipos de aparatos para esterilización	48
5.2.1. Esterilización por calor	49
5.3. Esterilización con vapor de agua	49
5.3.1. Control y registro de presión y temperatura	50
5.3.2. Calibración	51

5.3.3.	Verificación	51
5.3.4.	Uso	52
5.3.5.	Controles	52
5.3.6.	Registro	53
5.3.7.	Mantenimiento	53
5.3.8.	Seguridad	53
5.3.9.	Descontaminación	54
5.4.	Preparador de medios de cultivo	54
5.4.1.	Calibración y especificaciones	54
5.4.2.	Calibración	55
5.4.3.	Verificación	55
5.4.4.	Uso	55
5.4.5.	Controles	55
5.4.6.	Registro	55
5.4.7.	Mantenimiento	56
5.4.8.	Seguridad	56
5.5.	Olla a presión	56
5.5.1.	Calibración	56
5.5.2.	Verificación	56
5.5.3.	Uso	56
5.5.4.	Controles	57
5.5.5.	Registro	57
5.5.6.	Mantenimiento	57
5.5.7.	Seguridad	57
5.5.8.	Observaciones generales	57
5.6.	Estufa de esterilización (esterilización por calor seco)	58
5.6.1.	Especificaciones	58
5.6.2.	Calibración	58
5.6.3.	Uso	58
5.6.4.	Controles	59
5.6.5.	Registro	59
5.6.6.	Mantenimiento	59
5.6.7.	Seguridad	59
5.7.	Esterilización por filtración	60
5.7.1.	Especificaciones	60
5.7.2.	Uso	60
5.7.3.	Controles	60
5.7.4.	Registro	61
5.7.5.	Mantenimiento	61
5.7.6.	Seguridad	61
5.8.	Sistema de filtración de membrana	61
5.8.1.	Especificaciones	61
5.8.2.	Calibración	61
5.8.3.	Uso	62
5.8.4.	Controles	62
5.8.5.	Registro	62
5.8.6.	Seguridad	62

5.9.	Estufas de cultivo	62
5.9.1.	Especificaciones	63
5.9.2.	Calibración	63
5.9.3.	Verificación	64
5.9.4.	Uso	64
5.9.5.	Controles	64
5.9.6.	Mantenimiento	65
5.9.7.	Estufas con doble camisa	65
5.9.8.	Especificaciones, calibración, verificación	65
5.9.9.	Mantenimiento	65
5.10.	Baños de agua	65
5.10.1.	Especificaciones	65
5.10.2.	Calibración	65
5.10.3.	Verificación	66
5.10.4.	Uso	66
5.10.5.	Controles	66
5.10.6.	Registro	66
5.10.7.	Mantenimiento	66
5.11.	Microondas	66
5.12.	Termómetros	67
5.13.	pHmetros	67
5.13.1.	Especificaciones	68
5.13.2.	Calibración	68
5.13.3.	Controles	68
5.13.4.	Uso	68
5.13.5.	Mantenimiento	69
5.14.	Balanzas	69
5.14.1.	Calibración	69
5.14.2.	Controles	70
5.14.3.	Mantenimiento	70
5.15.	Sistema de desionización y destilación de agua	70
5.16.	Equipos para conservación en frío	70
5.17.	Incubación en anaerobiosis	71
5.17.1.	Controles	72
5.18.	Contadores de colonias	72
5.19.	Microscopios	72
5.20.	Lectores y lavadores de placas ELISA	72
5.20.1.	Especificación	73
5.20.2.	Controles	73
5.20.3.	Seguridad	73
5.21.	Listado de equipos y especificaciones técnicas	73
Capítulo 6. Materiales		75
6.1.	Introducción	75
6.2.	Envases para la toma de muestras	76
6.2.1.	Especificaciones de los envases de toma de muestras	76
6.2.2.	Envases de vidrio o plástico	77

6.2.3.	Cierres	77
6.2.4.	Bolsas de plástico	78
6.2.5.	Neutralización de los desinfectantes	78
6.2.6.	Esterilización de envases	79
6.2.7.	Control de la calidad de los envases para la toma de muestras	80
6.3.	Material de vidrio	81
6.3.1.	Especificaciones	81
6.3.2.	Procedimientos de limpieza	82
6.3.3.	Control de la calidad	82
6.4.	Pipetas	82
6.4.1.	Pipetas de vidrio y pipetas de plástico desechables	82
6.4.2.	Pipetas automáticas y puntas	82
6.4.3.	Verificación	82
6.4.4.	Esterilización	83
6.4.5.	Control de la calidad	83
6.5.	Placas de Petri	83
6.5.1.	Capacidad y especificaciones	83
6.5.2.	Esterilización y control de la calidad	83
6.6.	Utensilios metálicos	83
6.6.1.	Asas y agujas metálicas	83
6.6.2.	Pinzas y espátulas	84
6.7.	Tubos y cierres	84
6.7.1.	Tubos para dilución	84
6.7.2.	Frascos de cultivo, otros tubos, cápsulas y tapones	84
6.8.	Filtros de membrana	85
6.8.1.	Especificaciones físicas, químicas y biológicas	85
6.8.2.	Control de la calidad para la esterilidad de los filtros de membrana	85
6.8.3.	Procedimientos de control	86
6.8.4.	Retención	86
6.8.5.	Extracto total	86
6.8.6.	Extracto específico	87
6.9.	Tampones	87
6.9.1.	Especificaciones físicas, químicas y biológicas	87
6.9.2.	Procedimientos de control	87
6.10.	Agua desionizada/destilada	87
6.10.1.	Equipo	88
6.10.2.	Especificaciones	88
6.10.3.	Controles periódicos de la calidad del agua	89
6.10.4.	Comprobación de la idoneidad biológica del agua	89
6.11.	Medios de cultivo y reactivos químicos	89
6.11.1.	Control visual y registro	89
6.11.2.	Almacenamiento	90
6.11.3.	Colorantes bacteriológicos	90
6.11.4.	Antibióticos	90
6.11.5.	Preparación y dispensación	90
6.11.6.	Control del pH	91
6.11.7.	Control de la calidad de medios de cultivo preparados	92

6.11.8.	Control de esterilidad de medios de cultivo	92
6.11.9.	Otros controles: medios de cultivo para aislamiento o identificación bioquímica	92
6.11.10.	Otros controles para medios destinados al recuento de microorganismos	93
	Bibliografía	94
Capítulo 7.	Métodos cuantitativos y evaluación de procedimientos	95
7.1.	Introducción	95
7.1.1.	Características de las prestaciones desde un punto de vista científico y operativo	96
7.1.2.	Organismos diana	97
7.1.3.	Parámetros definidos por el método	97
7.2.	Principios de los recuentos microbiológicos en el agua y alimentos	98
7.2.1.	Enriquecimiento en medios de cultivo líquido	98
7.2.2.	Recuento de colonias	99
7.2.3.	Métodos microscópicos	100
7.2.4.	Métodos basados en la impedancia	101
7.2.5.	Métodos inmunológicos	101
7.2.6.	Métodos moleculares	102
7.2.7.	Medidas de ATP	102
7.2.8.	Métodos turbidimétricos.	102
7.3.	Normalización y validación	103
7.4.	Características matemáticas y técnicas de los métodos microbiológicos	106
7.4.1.	Fiabilidad de las medidas en microbiología	108
7.4.2.	Elementos de la exactitud	109
7.4.3.	Elementos de la precisión	111
7.4.4.	Robustez	114
7.5.	Métodos selectivos	115
7.5.1.	Caracterización numérica de los métodos selectivos	116
7.6.	Comparación y validación de los análisis de presencia/ausencia	118
7.6.1.	Un diseño de Número Más Probable para métodos de Presencia/Ausencia	120
7.7.	Expresión cuantitativa y estimación de la incertidumbre en los métodos microbiológicos.	121
7.7.1.	Error sistemático	121
7.7.2.	Imprecisión: valores de repetibilidad y reproducibilidad	121
7.7.3.	Alternativas para la desviación estándar en condiciones de repetibilidad (RSD)	122
7.8.	Diseños experimentales para la comparación de métodos de recuento de colonias	125
7.8.1.	Comparación de métodos con muestras artificiales inoculadas con cultivos puros	126
7.8.2.	Diseño general para detectar respuestas inconsistentes en los métodos o procedimientos: análisis de la varianza de dos factores con replicados	127
	Bibliografía	129

<i>Capítulo 8. Control de la calidad analítica en microbiología</i>	133
8.1. Introducción	133
8.2. Controles de primer nivel	135
8.2.1. Principios generales	135
8.2.2. Blancos	138
8.2.3. Inoculaciones en paralelo	138
8.2.4. Recuento de colonias en diferentes volúmenes/diluciones	144
8.2.5. Muestras para el control de la calidad de primer nivel en métodos cuantitativos (siembra en profundidad, en superficie, filtración sobre membrana)	149
8.2.6. Utilización de los gráficos de control	150
8.2.7. Control de las técnicas de Número Más Probable	153
8.2.8. Pruebas de confirmación	158
8.3. Controles de segundo nivel	160
8.3.1. Principios generales	160
8.3.2. Recuento duplicado	160
8.3.3. Procedimientos analíticos duplicados	165
8.3.4. Control de la calidad intensivo	167
8.4. Controles de tercer nivel	167
Bibliografía	169
<i>Capítulo 9. Tratamiento e informe de resultados</i>	171
9.1. Introducción	171
9.1.2. Registro de resultados	171
9.1.3. Tratamiento de resultados	172
9.2. Muestras solicitadas internamente	173
9.2.1. Muestras para control interno de la calidad	173
(verificaciones de primer, segundo o tercer nivel)	
9.2.2. Muestras para la evaluación externa de la calidad	174
9.2.3. Muestras analizadas como parte de un programa de investigación	175
9.3. Muestras enviadas al laboratorio	175
9.3.1. Muestras para supervisión de rutina	176
9.3.2. Muestras para control oficial	179
9.3.3. Muestras seriadas para supervisión de rutina	182
9.3.4. Muestras no rutinarias (para organismos patógenos o indicadores)	183
9.4. Ejemplos de impresos para solicitud de analítica e informe de resultados	183
Bibliografía	183
<i>Capítulo 10. Acreditación</i>	195
10.1. Introducción	195
10.2. Aspectos internacionales de la acreditación	195
10.3. El mercado único europeo	196
10.4. Entidades nacionales de acreditación	197
10.5. Requisitos de acreditación	199
10.6. Obtención de la acreditación	200

<i>Anexo.</i>	<i>Estadística para el aseguramiento de la calidad en microbiología de alimentos y agua</i>	<i>203</i>
1.	Cálculos básicos	203
2.	Distribuciones básicas	208
3.	Intervalos de confianza	215
4.	Pruebas estadísticas	218
5.	Análisis de la varianza	222
6.	Bibliografía	227
<i>Apéndices:</i>		
A.	Ejemplo para el control de filtros de membrana con evaluación estadística ..	229
B.	Preparación de muestras para el control de la calidad de primer nivel en recuentos en placa y por filtración	231
<i>Índice alfabético</i>		<i>233</i>