

**UNIVERSIDAD LAICA  
“ELOY ALFARO” DE MANABÍ**

**FACULTAD DE INGENIERÍA INDUSTRIAL**

**TESIS DE GRADO**

PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE GRADO DE:

**INGENIERO EN ALIMENTOS**

**TEMA:**

“VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE AEROBIOS Y COLIFORMES TOTALES EN MARGARINAS A REALIZARSE EN LA EMPRESA LA FABRIL S.A. DE LA CIUDAD DE MONTECRISTI, DURANTE EL PERIODO 2011-2012”

**AUTORA:**

Juana Pilar Castro Delgado

**DIRECTOR DE TESIS:**

ING. JUBER AZUA ALVIA

2011-2012  
MANTA – MANABÍ - ECUADOR



**UNIVERSIDAD LAICA  
“ELOY ALFARO” DE MANABÍ**

**FACULTAD DE INGENIERÍA INDUSTRIAL**

**TESIS DE GRADO**

PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE GRADO DE:

**INGENIERO EN ALIMENTOS**

**TEMA:**

“VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE AEROBIOS Y COLIFORMES TOTALES EN MARGARINAS A REALIZARSE EN LA EMPRESA LA FABRIL S.A. DE LA CIUDAD DE MONTECRISTI, DURANTE EL PERIODO 2011-2012”

**AUTORA:**

Juana Pilar Castro Delgado

**DIRECTOR DE TESIS:**

ING. JUBER AZUA ALVIA

2011-2012

MANTA – MANABI - ECUADOR



**UNIVERSIDAD LAICA “ELOY ALFARO” DE MANABÍ**

**FACULTAD DE INGENIERÍA INDUSTRIAL**

**TESIS DE GRADO**

“VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE AEROBIOS Y COLIFORMES TOTALES EN MARGARINAS A REALIZARSE EN LA EMPRESA LA FABRIL S.A. DE LA CIUDAD DE MONTECRISTI, DURANTE EL PERIODO 2011-2012”

Sometida a consideración del Honorable Consejo Directivo de la Facultad de Ingeniería Industrial de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, como requisito para obtener el título de:

**INGENIERO INDUSTRIAL**

Aprobado por el Tribunal Examinador:

---

DECANA DE LA FACULTAD

Ing. Leonor Vizuite Gaibor, Mba

---

JURADO EXAMINADOR

---

DIRECTOR DE TESIS

Ing. Juber Azua Alvia

---

JURADO EXAMINADOR

## AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por ser el ser supremo que me ha permitido tener los medios necesarios para completar esta etapa de mi vida y convertirse en mi fuerza de voluntad en los momentos más difíciles. A mis familiares en especial a mi hermano Héctor Castro Delgado, que con su ejemplo, apoyo permanente durante toda mi vida y sus valiosos consejos me han permitido formarme como una persona de bien.

Le doy gracias en especial al Ingeniero Joubert Azua como Director Tesis y a mis compañeros de trabajos de la Empresa LA FABRIL S.A. los cuales me han ayudado y orientado en mi formación académica y a los profesores de la Escuela de Ingeniería de Alimentos de la ULEAM, que han sabido encaminar correctamente esta unidad académica a fin de preparar profesionales con una alta formación académica, humanista, moral y ética.

---

Juana Pilar Castro Delgado

## DEDICATORIA.

Dedico este trabajo principalmente a mi madre por ser parte importante de mi formación a mis hermanos por haberme dado el apoyo y la comprensión durante toda mi vida.

---

Juana Pilar Castro Delgado

## **RESPONSABILIDAD DEL DIRECTOR DE TESIS**

En mi calidad de Director de Tesis, certifico, que el trabajo versado sobre “Validación de los Métodos Microbiológicos para la Determinación de Aerobios y Coliformes Totales en Margarinas a Realizarse en la Empresa la FABRIL S.A. de la ciudad de Montecristi, durante el periodo 2011-2012” presentado previo la obtención del título de INGENIERO EN ALIMENTO, fue elaborado bajo mi dirección, orientación y supervisión; sin embargo, el proceso investigativo, los conceptos y resultados son de exclusiva responsabilidad de la egresada Juana Pilar Castro Delgado.

---

Ing. Joubert Antonio Azua Alvia

DIRECTOR DE TESIS

## **RESPONSABILIDAD DEL AUTOR.**

La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en ésta tesis de grado, corresponden exclusivamente al autor y el patrimonio intelectual a la tesis de grado corresponderá a la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí.

---

Juana Pilar Castro Delgado

## ***INDICE GENERAL***

<b>I</b>	<b>Portada</b>	
<b>II</b>	<b>Agradecimiento</b>	
<b>III</b>	<b>Dedicatoria</b>	
<b>IV</b>	<b>Responsabilidad del Director de Tesis</b>	
<b>V</b>	<b>Responsabilidad del Autor</b>	
<b>IV</b>	<b>Introducción</b>	

### **CAPÍTULO 1**

#### **La Fabril y el Laboratorio de Microbiología**

	<i>Pág.</i>
1.1 Generalidades	1- 4
1.2 Valores	4-7
1.3 Misión	8
1.4 Visión	8
1.5 Política integrada de calidad, inocuidad, medio ambiente, Seguridad y salud de la FABRIL S.A.	8-9
1.6 Portafolio de Productos	10
1.6.1. División de alimentos	10-11
1.6.2. División de Hogar y Cuidado Personal	12-13
1.6.3. División panificación y pastelería	14-15
1.6.4 División Industrial de aceites y grasas	15
<b>1.6.5</b> División Industrial de Suplementos Funcionales	16

1.6.6	División industrial de jabones y detergentes	16-17
1.7	Plano de la empresa LA FABRIL S.A	18
1.8	Descripción del Laboratorio de Microbiología	19-20
1.8.1	Área de preparación de materiales	21
1.8.2	Área de preparación de medios de cultivo	21-22
1.8.3	Sala de incubadoras	22
1.8.4	Sala estéril	23
1.9	Sistema de monitoreo y análisis microbiológico	24-34

## **CAPÍTULO 2**

### **Marco Teórico**

2.1	Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL)	35-39
2.2	Norma ISO/IEC 17025	40-43
2.3	Validación de los Métodos Microbiológicos	43-47
2.3.1	Tipos de Validación según sus objetivos	47-48
2.3.2	Parámetros Microbiológicos para la Validación de una técnica o método	49-58
2.4	Métodos de Ensayo Microbiológicos	58-61
2.4.1	Métodos de Ensayos Microbiológicos Cualitativos	61-62
2.4.2	Métodos de Ensayos Microbiológicos Cuantitativos	62-63
2.5	Requisitos Microbiológicos de las Margarinas	64
2.6	Definiciones	64

## **CAPÍTULO 3**

### **Diagnósticos del Laboratorio de Microbiología de la FABRIL**

3.1	Ingreso al laboratorio de microbiología	74-75
3.2	Nivel de Bioseguridad	75
3.3	Técnicas microbiológicas apropiadas	76-83
3.4	Eliminación de los reactivos	83-86
3.5	Manipulación de las muestras	86-88
3.6	Análisis de la Propuesta de Validación	89-90

## **CAPÍTULO 4**

### **Validación del Método de Ensayo para la Determinación de Aerobios en Margarinas.**

4.1.	Necesidad Analítica	91
4.2.	Método	91
4.3.	Borrados del Procedimiento	92
4.3.1	Definición y Alcance	92
4.3.2	Materiales, Equipos y Reactivos	92-93
4.3.3	Procedimiento	93-95
4.4.	Identificación de las variables que intervienen en el método	95
4.4.1	Identificación de requisitos	96
4.5.	Elección de los parámetros de validación. Fijación de los Objetivos de validación	96
4.6.	Diseño experimental y estadístico	97
4.7.	Realización	98
4.7.1	Preparación de la muestra	98-99
4.7.2	Reactivación de Cepas y preparación de la solución de trabajo	99-101

4.7.3	Inoculación de la solución de bacteria en la muestra	101-106
4.8.	Tratamiento estadísticos de los datos obtenidos	106-107
4.9.	Declaración de método validado	108

## **CAPÍTULO 5**

### **Validación del Método de Ensayo para la Determinación de Coliformes Totales en Margarinas.**

5.1.	Necesidad Analítica	109
5.2.	Método	110
5.3.	Borrados del Procedimiento	110-111
5.3.1	Definición y Alcance	110-111
5.3.2	Materiales, Equipos y Reactivos	111
5.3.3	Procedimiento	112
5.4.	Identificación de las variables que intervienen en el método	112
5.4.1	Identificación de requisitos	113
5.5.	Elección de los parámetros de validación. Fijación de los Objetivos de validación	114
5.6.	Diseño experimental y estadístico	114-115
5.7.	Realización	115
5.7.1	Preparación de la muestra	115-117
5.7.2	Reactivación de Cepas y preparación de	

solución de trabajo	117-119
5.7.3 Inoculación de la solución de bacteria en la muestra	119-124
5.8. Tratamiento estadísticos de los datos obtenidos	124-125
5.9. Declaración de método validado	126

## **CAPÍTULO 6**

### **Conclusiones y Recomendaciones**

6.1 Conclusiones	127-128
6.2 Recomendaciones	128

## **BIBLIOGRAFIA**

## **ANEXOS**

## **TEMA**

“VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE AEROBIOS Y COLIFORMES TOTALES EN MARGARINAS A REALIZARSE EN LA EMPRESA LA FABRIL S.A. DE LA CIUDAD DE MONTECRISTI, DURANTE EL PERIODO 2011-2012”

## INTRODUCCION

El presente trabajo investigativo de tesis cuyo tema es: “Validación de los Métodos Microbiológicos para la Determinación de Aerobios y Coliformes Totales en Margarinas a Realizarse en la Empresa la FABRIL S.A. de la ciudad de Montecristi, durante el periodo 2011-2012” tiene como objetivo general la validación de los métodos microbiológicos en el Laboratorio de microbiología de la empresa la FABRIL.

Con el fin de brindar mayor confiabilidad a nuestros consumidores y satisfacer los requerimientos de los clientes, se crea la necesidad de validar los métodos que se emplean para pruebas de análisis microbiológicos en margarinas.

Por esto se vio la necesidad de crear laboratorios de análisis de alimentos que brinden asesoría a las personas y/o empresas productoras de alimentos en cuanto a análisis de calidad de sus productos, análisis que van desde la

caracterización físico química hasta el análisis microbiológicos para determinar la confiabilidad de este y verificar si cumplen o no los niveles de calidad requeridos para que dichos productos puedan salir al mercado y tener aceptación entre los consumidores.

En vista de que los laboratorios que realizan ensayos físico-químicos y microbiológicos de alimentos, aguas y efluentes industriales, tienen la necesidad imperiosa de contar con un reconocimiento tanto a nivel nacional como internacional de la calidad de los servicios que están prestando a la industria y a la organización en general, deben acreditarse ante un Organismo Competente en la norma ISO/IEC 17025.

Por lo tanto es menester que el Laboratorio de la FABRIL cumpla con todos los requisitos establecidos por la norma ISO/IEC 17025, siendo un requisito fundamental para la acreditación, la validación de los procedimientos específicos de ensayo. El Laboratorio no cuenta con un Procedimiento General para la Validación de los ensayos microbiológicos, por ende es importante que se implemente un procedimiento general, que establezca

la forma adecuada de tratar los materiales de referencia certificados, las cepas de referencia de microorganismos, seleccionar los parámetros de validación, proponer los objetivos de la validación, definir el diseño experimental y el tratamiento estadístico de los resultados; todo ello con el objetivo de realizar la validación de los procedimientos específico del área de microbiología y que puedan ser acreditados en la norma ISO/IEC 17025.

# **CAPÍTULO 1**

## **LA FABRIL Y EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA**

### **1.1 Generalidades**

LA FABRIL, es una empresa Ecuatoriana fundada en 1937 como comercializadora textil. En 1968, reinicia sus operaciones como comercializadora de algodón en rama extendiéndose rápidamente al sector agroindustrial como desmotadora de algodón y procesadora de semilla de algodón. En 1978 incursiona ya en la rama industrial como Refinadora de aceites y grasas vegetales. Muy pronto, en 1981 se orienta al manejo autónomo del suministro de sus materias primas, integrando así al grupo dos compañías dedicadas a la producción y extracción de aceite de palma. Finalmente, en 1983 incluye dentro de sus planes industriales la producción de jabones de lavar.

En el transcurso de los últimos años, LA FABRIL ha logrado conseguir en sus unidades productivas elevados niveles de confiabilidad buscando siempre innovar en mecanización y tecnología. Es así como ha sido la

primera en instalar en Ecuador equipos de fraccionamiento en seco de aceite de palma y palmiste con filtros de alta presión, y equipos de interesterificación; y como consecuencia posee las plantas de procesamiento de margarinas, aceites y mantecas más modernas del país.

LA FABRIL impulsa una estrategia de mercadeo imaginativa y agresiva siendo los primeros en lanzar al mercado Ecuatoriano productos como:

- Mantecas 100% vegetal, sin sabor, en empaques reutilizables.
- Aceite para consumo en fundas.
- Aceite de soya TRIREFINADO, especial para el enlatado de atún.
- Margarinas de mesa sin materias primas hidrogenadas.

En la década del 90 LA FABRIL constituyó el primer centro de investigación y desarrollo de aceites y grasas vegetales en el país. En éste centro se ha desarrollado productos grasos con alto valor agregado, como sustitutos y extensores de manteca de cacao con bases de aceite de Palma y Palmiste. Adicionalmente, se trabajó de la mano con nuestros clientes

industriales para el desarrollo de productos grasos que estuvieran acordes a los requerimientos que sus procesos necesitaran, logrando así tomar gran porción del mercado de consumo industrial.

En esta década se impulsó la diversificación de los negocios. Se inaugura la fábrica de plásticos (envases), produciendo así nuestros propios envases para los aceites, mantecas y margarinas y nace la línea de productos de limpieza, aplicando la misma tendencia de investigación logrando rápidamente ubicar productos diferenciados en el mercado Ecuatoriano. Se puso en funcionamiento la planta de refinación física más moderna de Latinoamérica; y se arranco con nueva planta de producción de jabones.

Desde 1991 LA FABRIL incursiona exitosamente en el mercado internacional ofreciendo productos diferenciados y de calidad reconocida; teniendo entre sus clientes más importantes: Frito Lay, Nestlé, Carozzi, Watt's, Dánica, entre otros. Abarcando mercados como Venezuela, Colombia, Panamá, Perú, Chile, México y Argentina.

Con una sostenida tasa de crecimiento en los últimos 20 años, en el año 2002 LA FABRIL logró incorporar a la empresa el negocio de aceites y grasas de Unilever BestFoods que incluye además de la unidad productiva, las marcas de Aceite: La Favorita, La Favorita Light, Criollo, La Favorita Achiote, y las marcas de margarina: Marva y Hojaldrina, entre otras. Estos hechos convierten a LA FABRIL en la empresa más grande del sector de aceites y grasas comestibles del país y en un actor muy importante en la industria de oleaginosas latinoamericana.

Como productor de jabones de lavar LA FABRIL se encuentra liderando la posición de ventas en valor en el sector ofreciendo productos diferenciados que satisfacen las cambiantes necesidades del consumidor Ecuatoriano.

## **1.2 Valores**

Son los principios o creencias que guían a LA FABRIL y que constituyen la base para la creación de políticas, procedimientos, normas y la toma de decisiones, que deben ser de estricto respeto y cumplimiento por parte de todo el personal de la empresa.

A continuación se describen los principios de La Fabril:

### **Liderazgo**

Ser líder es ser modelo, ser maestro, ser facilitador, ser integrador. Esto quiere decir que La Fabril debe ser líder en el Ecuador; sus ejecutivos deben ser líderes de sus equipos de trabajo, sus colaboradores deben ser líderes en sus respectivas actividades.

La búsqueda y mantenimiento del liderazgo se caracterizará por:

- **Perseverancia** en todas las acciones que nos conduzcan a mantener el liderazgo.
- **Integridad.** Esta palabra implica rectitud, honradez, intachabilidad. Una persona íntegra es alguien en quien se puede confiar porque lo que dice significa eso “lo que dijo”; cuando hace una promesa tiene la plena intención de cumplirla,
- **Legalidad.** Apego a las leyes y normas establecidas.

### **Agregar Valor**

Agregamos valor cuando todas las acciones que realizamos a diario, en el cargo en que nos encontramos, contribuyen al propósito central de LA FABRIL: “satisfacer a nuestros clientes”.

Para lograrlo nos apoyamos en:

- **La innovación:** Descubrir, proponer y ejecutar acciones continuas para mejorar los servicios y productos, de forma gradual (mejoramiento continuo) o radical (cambios significativos).
- **El dinamismo,** cumplir activamente las metas acordadas. Además de buscar activamente y explorar de forma inteligente oportunidades para el crecimiento personal y de La Fabril.

Nuestra gestión dinámica e innovadora hará que los potenciales clientes perciban a La Fabril y sus productos como los de mayor valor al momento de tomar su decisión de compra.

### **Calidad**

“Ofrecer nuestros productos o servicios para la completa satisfacción de nuestros clientes, a precios competitivos”.

Quien califica nuestros productos es el cliente, él será nuestro juez y es quien va a escoger entre nuestros productos o los de la competencia. Para este efecto deberemos cuidar los 3 componentes de la calidad:

- **Servicio:** que es cuando le entregamos el producto al cliente sin retrasos, con la calidad requerida y con una atención especializada.
- **Flexibilidad:** que es adaptarse rápidamente a las necesidades de sus

clientes y darle lo que requiere en el momento que lo necesita.

• **Eficiencia:** hacer bien las cosas a la primera vez, cumpliendo las normas y estándares establecidos y utilizando la menor cantidad de recursos sin afectar el resultado esperado. Esto significa eliminar reproceso, desperdicios, devoluciones, demoras, quejas de los clientes; tomar decisiones adecuadas y oportunas.

### **Respeto**

Valoramos a todas las personas, consideramos su dignidad y aceptamos el derecho que tienen a ser diferentes.

Nuestros clientes son nuestra razón de ser; nuestros colaboradores y puede cumplir su propósito, por eso respetaremos los compromisos acordados con cada uno de ellos.

Fomentamos un ambiente en el que todos los empleados actúen con valor, integridad, honestidad y rectitud. Estamos comprometidos a crear una atmósfera sin discriminación de cualquier tipo, en donde las diferencias se respetan y se valoran.

Proveeremos **desarrollo** a nuestros colaboradores motivándolos, capacitándolos y apoyando su participación, en todas nuestras actividades. Promoveremos la **integración** entre compañeros, entre áreas y con los proveedores; respetar la diversidad nos permitirá trabajar en equipo y lograr nuestras metas.

### **1.3 Misión.**

Producir y comercializar productos de calidad superior al menor costo de una manera eficaz, eficiente y flexible, con una constante vocación de servicio; fortaleciendo día a día nuestra estructura financiera; trabajando como un sólido equipo humano; superando a la competencia en el manejo del entorno; creando marcas de indiscutible liderazgo en el Mercado

### **1.4 Visión.**

La Fabril será: La empresa símbolo de la nueva industria ecuatoriana, pujante, solvente y rentable, reconocida nacional e internacionalmente por: sus ideas innovadoras, sus altísimos estándares de calidad y productividad, y sus marcas líderes.

### **1.5 Política Integrada de Calidad, Inocuidad, Medio Ambiente, Seguridad y Salud de la FABRIL S.A.**

Somos una organización que fábrica, comercializa y exporta productosoleaginosos, sus derivados, producto de higiene y cuidado

personal en forma de artículos para consumo masivo e ingredientes para uso industrial, que se compromete a:

- 1 Satisfacer plenamente las necesidades del cliente interno y externo ofreciendo productos seguros e inocuos y/o servicios que cumplan estándares de calidad nacional e internacional.
- 2 Mejorar continuamente sus sistemas de gestión, proporcionando recursos económicos, tecnológicos y humanos para revisar, establecer y cumplir sus objetivos y metas planificadas.
- 3 Capacitar al equipo humano respetando su individualidad para potenciar sus habilidades y desarrollar sus destrezas.
- 4 Establecer medidas para minimizar continuamente los impactos ambientales mediante la identificación, evaluación, medición, prevención de los mismos, y su desempeño ambiental.
- 5 Cumplir los requerimientos legales aplicables y otros requisitos suscrito por la Fabril.
- 6 Gestionar los factores de riesgo identificados, para mejorar las condiciones de seguridad y salud en el trabajo de todos sus colaboradores.

## **1.6 Portafolio de productos**

Entre las principales líneas de productos fabricados por La Fabril S.A.tenemos:

### **1.6.1 División de ALIMENTOS**

LA FABRIL crea, diseña y fabrica productos con características únicas para satisfacer los requerimientos de la vida moderna.

La tecnología aplicada a los procesos de refinación han permitido considerables cambios para lograr productos acordes a las tendencias del mercado, hoy el énfasis está en los aspectos nutricionales y funcionales, por eso ponen especial atención en no generar ácidos TRANS (grasas saturadas) y en preservar el contenido de pro vitaminas y antioxidantes naturales, los triglicéridos poliédricos y los productos secundarios de oxidación son objeto de un estricto control en el proceso de sus productos.

- ACEITES

- La Favorita

- La Favorita Light
- La Favorita Omega
- La Favorita Crecer
- La Favorita Achiote
- Girasol
- Girasol oliva
- Maizol
- La Perla
- Criollo
- Sabrosón
- Sabrofrito
- Sabrosalsa

- MARGARINAS

- Klar
- Girasol
- Marva
- Ricamesa

- MANTECAS

➤ La Sabrosa

### **1.6.2 División de Hogar y Cuidado Personal**

La Fabril S.A. es una de las industrias más importantes y considerada como las grandes en la producción de jabones de lavar y tocador.

En los últimos tiempos ha ido expandiendo sus líneas a desinfectantes, crema lavavajillas y detergentes líquidos.

Hoy en día la visión es desarrollar y relanzar una innovadora amplia gama de productos de limpieza en general, rentable, con altísimos estándares de calidad fortaleciendo y creando marcas de liderazgo.

Con la misión de suministrar insumos para la higiene industrial, familiar y personal, de una manera eficiente, en las mejores condiciones de rentabilidad, calidad, atractivo visual, precio, fácil manipulación y amigables con el medio ambiente.

- Jabones de tocador
  - Defense
  - Duet
  - Jolly
- Jabones de lavar
  - Lava todo
  - Megablu
  - Machete
  - Perla
  - Perla bebe
- Detergentes líquidos
  - Ciclón
  - Perla bebe
  - Perla secret
- Desinfectante
  - Olimpia
- Suavizantes
  - Perla soft

- Detergentes en polvo
  - Lava todo chips

### **1.6.3 División Panificación y Pastelería**

La panadería industrial ha tenido un vertiginoso desarrollo en los últimos años con productos que combinan textura, formas y colores.

La Fabril S.A. tiene amplia experiencia en simular procesos de fabricación de postres y panes industriales donde la grasa es fundamental en la lubricación, la textura y la sensación gustativa, ofrecemos una gran variedad de combinaciones de grasas, además de un amplio rango de grasas para rellenos pasteleros basados en fracciones de palma y palmiste.

- Mantecas
  - Especial
  - Sabropan
  - Panpan
- Margarinas
  - Marva

- Marva crema
- Fabripan
- Hojaldrina
- Coberturas
  - Coberchoc gotas
  - Coberchoc crema

#### **1.6.4 División Industrial de Aceites y Grasas**

La Fabril cuenta con prácticas instalaciones diseñadas para la evaluación funcional de sus productos en el campo de:

- ❖ Frituras
- ❖ Chocolates
- ❖ Panificación y Repostería
- ❖ Galletería
- ❖ Helados
- ❖ Cremas
- ❖ Salsas y Mayonesas

## **2.6.5 División Industrial de Suplementos Funcionales**

- ❖ Toco 550
- ❖ Toco 880 G
- ❖ Toco 880 BA
- ❖ Toco BP

## **1.6.6 División Industrial de Jabones y Detergentes**

En el área de HCP (Higiene y Cuidado Personal), también cuenta con pruebas de aplicación y validación de los productos, ensayos de eficacia, performance y atributos físicos. La Fabril cuenta con:

- Cabinas Piloto

Para la evaluación de Calidad e Intensidad de fragancias de Desinfectantes y Limpiadores Fragantes.

- Cabina con simulación de luz solar

Para la evaluación de colores tanto de jabones como prendas después de lavadas sobre todo para calificación de blancos, despercidos y retiro de manchas.

➤ Lavadora

Para probar funcionabilidad de la línea de detergentes líquidos y en polvo.

➤ Cabina para evaluación de residualidad

De fragancias en jabones de lavar así como estudio de desgaste de barras

➤ Biocámaras

Para el control de estabilidad, simulando temperaturas de almacenamiento normal y acelerado, permitiendo determinar el tiempo de vida útil de los productos.

➤ Instrumentos de laboratorio

Para análisis físico químico de materias primas, insumos, aditivos y productos terminados. Muy importante para establecer nuestros parámetros de trabajo durante el desarrollo y extensión de especificaciones al momento de entregar a la producción el nuevo producto.



## **1.8 Descripción del Laboratorio de Microbiología**

Las instalaciones del laboratorio de microbiología se encuentran localizadas en la planta de envasado de grasas, cerca al mezanine, el laboratorio cuenta con áreas distribuidas para que no exista una contaminación cruzada al producto.

Actualmente el laboratorio de microbiología presta servicios a toda la planta realizando monitoreos de los productos, materias primas, higiene del personal, agua industrial y de consumo, monitoreo de la calidad de aire entre otras.

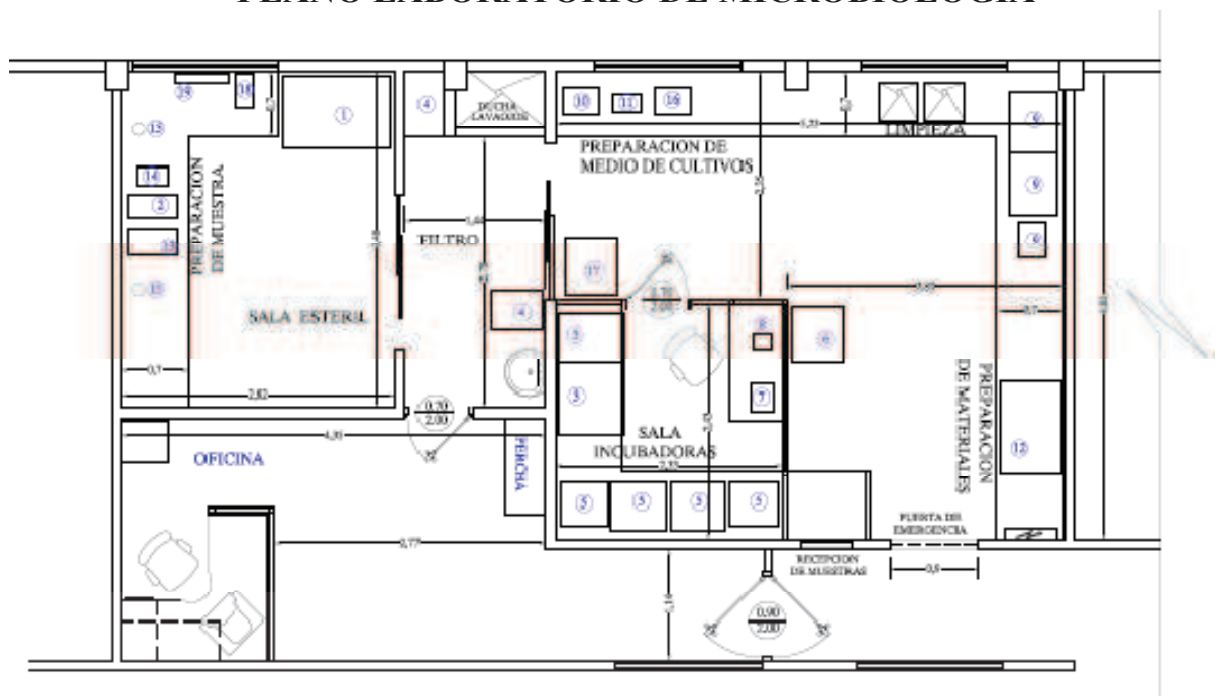
El laboratorio de microbiología realiza análisis microbiológicos a las margarinas industriales y de mesa, coberturas de chocolate, grasa, mantecas, ingredientes para la elaboración de margarinas, materiales de empaque, entre otros análisis.

En el laboratorio de microbiología el personal trabaja en turno rotativo, en la actualidad existen dos microbiólogos y dos asistente.

El laboratorio cuenta con áreas distribuidas, las cuales se mencionan en la continuación:

- Área de Preparación de Materiales
- Preparación de medios de cultivo
- Sala de incubadoras
- Sala estéril

### PLANO LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA



LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA A&G

ESCALA 1:50

#### SIMBOLOGIA

1. Cámara de Seguridad Biológica	6. Refrigerador	11. Stir Plate	16. Potenciometro
2. Baño Maria	7. Contador de Colonias	12. Breda	17. Vitrina Refrigerada
3. Incubadores	8. Microscopio	13. Baño Maria	18. Bomba de vacío
4. Equipo Protección Personal	9. Autoclave	14. Balanza	19. Equipo de Filtración
5. Incubadores	10. Hornilla eléctrica	15. Mechero	

### **2.8.1 Área de preparación de materiales**

En esta área se preparan los materiales una vez que hayan sido lavados y secados, consta con los siguientes equipos:

- Autoclave de esterilización
- Autoclave para descontaminación
- Estufa de esterilización y de secado

Junto a esta área se encuentra ubicada la recepción de muestras y cuentan con una puerta de emergencia.

### **2.8.2 Área de preparación de medios de cultivo**

En esta área se preparan los medios de cultivos y cuenta con los siguientes equipos:

- Balanza
- Hot Plate
- Hornilla eléctrica

- Potenciómetro
- MAS 100
- HY lite

### 2.8.3 Sala de incubadoras

El laboratorio de Microbiología de la Fabril cuenta con seis incubadoras cada una desempeña su función y a la vez cada equipo se encuentra calibrado por un ente externo.

<b>TEMPERATURAS DE INCUBACION DE MICROORGANISMOS</b>		
<b>MUESTRAS</b>	<b>TIPOS DE ANALISIS</b>	<b>TEMPERATURA INCUBACION</b>
Ambiente y/o Calidad de aire	Recuento total de microorganismos (Aerobios mesofilos)	30°C
Superficies vivas e inerte (Higiene personal e instalaciones)	Coliformes Totales	35°C
	Aerobios mesofilos	
Análisis de Agua	Coliformes Totales	35°C
	Coliformes Fecales	44.5 °C
	Aerobios mesofilos	35°C
Margarinas de mesa/ industrial	Aerobios mesofilos	32°C
	E. coli/Coliformes	35°C
	Mohos y Levaduras	25°C
	Staphylococcus aureus	35°C
Coberturas de Chocolates	Coliformes Totales	35°C
	Mohos y Levaduras	25 °C
	Aerobios mesofilos	35°C

En esta área se encuentra ubicado el microscopio y el contador de colonias

### **2.8.4 Sala estéril y oficina**

En el área estéril es donde se preparan las muestras para su debido proceso de siembra esta sala cuenta con los siguientes equipos:

- Cabina de seguridad biológica
- Bomba de vacío
- Equipo de filtración
- Balanza
- Baño maría
- Stomacher

**Oficina** La oficina se encuentra ubicada junto al laboratorio de Microbiología, cuenta también con un área filtro a donde se realiza el intercambio de mandiles y se encuentran los equipos de protección personal.



## PLANTA ENVASADO DE LÍQUIDOS

Muestra	Frecuencia de muestreo	Lugar	Características a medir	Método de análisis	Especificación	Responsable
Superficies vivas (Manos del personal) <sup>c</sup>	Quincenal	Sala envasado	Aerobios mesófilos	MA.80 / MA.88	Satisfactorio: $< 3 \times 10^3$ UFC*	M I C R O B I O L O G O
			Coliformes totales	MA.86 / MA.81	$< 10 \times 10^1$ UFC*	

## ALMACEN MQE

Muestra	Frecuencia de muestreo	Lugar	Características a medir	Método de análisis	Especificación	Responsable
Ambiente y/o Calidad de aire <sup>d</sup>	Mensual	MQE #1	Recuento total de microorganismos (Aerobios mesófilos)	MA.91	$< 8 \times 10^2$ UFC/m <sup>3</sup> *	M I C R O B I O L O G O
		MQE #2				
		MQE #3				
		MQE #4				
		MQE #5				

## ALMACEN CND

Muestra	Frecuencia de muestreo	Lugar	Características a medir	Método de análisis	Especificación	Responsable
Ambiente y/o Calidad de aire <sup>d</sup>	Mensual	FRIO 1	Recuento total de microorganismos (Aerobios mesófilos)	MA.91	$< 8 \times 10^2$ UFC/m <sup>3</sup> *	M I C R O B I O L O G O
		FRIO 2				
		FRIO 3				
		FRIO 4				
		FRIO 5				
		Modulo 1				

\*c Norma Oficial Mexicana.NOM-093-SSA1-1994

\*d Recopilación normas microbiológicas de alimentos y asimilados y otros parámetros físico químicos de interés sanitario. Junio 2010.

Sistema de climatización. Noma UNE 100012. Enero 2005. Página 35.

# PLANTA CHOCOLATES

Muestra	Frecuencia de muestreo	Lugar	Características a medir	Método de análisis	Especificación	Responsable
Ambiente y/o Calidad de aire <sup>d</sup>	Mensual	Sala Preparación	Recuento total de microorganismos (Aerobios mesófilos)	MA.91	< 8 x 10 <sup>2</sup> UFC/m <sup>3</sup> *	M I C R O B I O L O G O
		Sala Procesos				
		Sala Empaque				
		Almacén temperado				
Agua de osmosis <sup>b</sup>	Mensual	Lavatorio de manos	Coliformes fecales	MA.85	Ausencia/100 ml *	
Superficies vivas (Manos del personal) <sup>c</sup>	Quincenal	Sala envasado	Aerobios mesófilos	MA.80 / MA. 88	Satisfactorio: < 3 x 10 <sup>3</sup> UFC*	
			Coliformes totales	MA.86 / MA.81	< 10 x 10 <sup>1</sup> UFC*	
Superficies inertes <sup>e</sup>	Mensual	Tanques, Equipos, Máquinas, Instalaciones	Aerobios mesófilos	MA.80/ MA.88	Limpio: 2 - 10 UFC/cm <sup>2</sup> *	
					Acceptable: 10 - 100 UFC/cm <sup>2</sup> *	
					Sucio: > 100 UFC/cm <sup>2</sup> *	
			Coliformes totales	MA.81/ MA.86	< 1 UFC/cm <sup>2</sup>	
Coberturas de chocolates <sup>f</sup>	Cada Lote	Envasado de chocolates	Aerobios mesófilos	MA.88	1 x 10 <sup>3</sup> UFC/g	
			Coliformes totales	MA.86	< 1 x 10 <sup>1</sup> UFC/g	
			Mohos y levaduras	MA.98	1 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	
			Salmonella spp. * @	MA.101/102	Ausencia	

# PLANTA CHOCOLATES

Muestra	Frecuencia de muestreo	Lugar	Características a medir	Método de análisis	Especificación	Responsable
Materia Prima Licor de cacao <sup>g</sup>	Cada Lote	MQE Empaque	Coliformes totales	MA.86	$< 1 \times 10^1$ UFC/g	M I C R O B I O L O G O
			E. coli	MA.86	Ausencia	
			Mohos y levaduras	MA.98	Máx $5 \times 10^1$ UFC/g	
			Salmonella spp.*@	MA.101/102	Ausencia	
Materia Prima Leche descremada <sup>h</sup>	Cada Lote	MQE Empaque	Aerobios mesófilos REP, ufc/g	MA.88	$5 \times 10^3$ UFC/g	
			Enterobacterias, ufc/g	MA.96	ausencia	
			Mohos y levaduras	MA.98	$< 1 \times 10^1$ UFC/g	
			Salmonella spp.*@	MA.101/102	Ausencia	
			Staphylococcus aureus coag. Pos.	MA.87	$1 \times 10^1$ UFC/g	
Materia Prima Cacao en polvo <sup>i</sup>	Cada Lote	MQE Empaque	Aerobios mesófilos REP	MA.80 / MA.88	$1 \times 10^3$ UFC/g	
			Coliformes totales	MA.81 / MA.86	$< 1 \times 10^1$ UFC/g	
			E. coli	MA.86	Ausencia	
			Salmonella spp.*@	MA.101/102	Ausencia	
			Mohos y levaduras	MA.98	Máx $5 \times 10^1$ UFC/g	
Materia Prima Azúcar granulada <sup>j</sup>	Cada Lote	MQE Empaque	Aerobios mesófilos REP	MA.88	Máx $2 \times 10^2$ UFC/g	
			Coliformes totales	MA.86	$< 1 \times 10^1$ UFC/g	
			Mohos y levaduras	MA.98	Máx $1 \times 10^2$ UFC/g	
Materia Prima Azúcar pulverizada <sup>k</sup>	Por requerimiento del cliente Seguimiento un (1) lote mensual	MQE Empaque	Aerobios mesófilos REP	MA.88	Máx $2 \times 10^2$ UFC/g	
			Coliformes totales	MA.86	$< 1 \times 10^1$ UFC/g	
			Mohos y levaduras	MA.98	Máx $1 \times 10^2$ UFC/g	

# PLANTA CHOCOLATES

Muestra	Frecuencia de muestreo	Lugar	Características a medir	Método de análisis	Especificación	Responsable
Materia Prima Butter oil <sup>l</sup>	Cada Lote	MQE Empaque	Aerobios mesófilos REP	MA.88	Máx 1 x 10 <sup>4</sup> UFC/g	M I C R O B I O L O G
			Coliformes totales	MA.86	< 1 x 10 <sup>1</sup> UFC/g	
			Mohos	MA.98	< 1 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	
			Levaduras	MA.98	< 1 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	
			E. Coli	MA.86	Ausencia	
			Staphylococcus aureus	MA.87	< 1 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	

\*<sup>b</sup> NTE INEN 1108: 2011 Agua Potable: Requisitos.

\*<sup>c</sup> Norma Oficial Mexicana.NOM-093-SSA1-1994

\*<sup>d</sup> Recopilación normas microbiológicas de alimentos y asimilados y otros parámetros físico químicos de interes sanitario. Junio 2010

Sistema de climatización. Norma UNE 100012. Enero 2005. Página 35.

\*<sup>e</sup> Recopilación normas microbiológicas de alimentos y asimilados y otros parámetros físico químicos de interes sanitario. Junio 2010

Peter Snyder. Congreso celebrado en Victoria-Gasteiz 1995. Página 35.

\*<sup>f</sup> NTE INEN 621:2010 Chocolates: Requisitos.

\*<sup>g</sup> FTM. 4001001 Licor de cacao. LA FABRIL S.A. Manta

\*<sup>h</sup> FTM. 4001002 Leche descremada en polvo. LA FABRIL S.A Manta

\*<sup>i</sup> FTM. 4001003 Polvo de cacao. LA FABRIL S.A.Manta

\*<sup>j</sup> FTM. 3001058 Azúcar granulada. LA FABRIL. S.A. Manta

\*<sup>k</sup> FTM.4001005 Azúcar pulverizada. LA FABRIL S.A. Manta.

\*<sup>l</sup> FTM.3001031. Butter oil. LA FABRIL S.A. Manta.

\*@ Seguimiento anual de dos (2) muestras de productos recibidos

## PLANTA ENVASADO DE GRASAS

Muestra	Frecuencia de muestreo	Lugar	Características a medir	Método de análisis	Especificación	Responsable
Margarina de mesa/ industrial <sup>m</sup>	Cada lote	Envasado de Margarinas	Aerobios mesófilos <b>REP</b>	MA.88	1.0 x 10 <sup>4</sup> UFC/g	M I C R O B I O L O G O
			Coliformes totales	MA.86	< 1.0 x 10 <sup>1</sup> UFC/g	
			E. coli	MA.86	< 1.0 x 10 <sup>1</sup> UFC/g	
			Mohos y levaduras	MA.89	1.0 x 10 <sup>2</sup> UP/g	
			Staphylococcus aureus	MA.87	1.0 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	
Grasas	Seguimiento anual	Envasado de Margarinas	Aerobios mesófilos <b>REP</b>	MA.88	1.0 x 10 <sup>3</sup> UFC/g	
			Mohos y levaduras	MA.89	1.0 x 10 <sup>2</sup> UP/g	
			Salmonella spp.***	MA.101/102	Ausencia	
Materia Prima Suero de leche <sup>n</sup>	Cada lote	MQE Empaque	Aerobios mesófilos <b>REP</b>	MA.88	10000 Máx	
			Coliformes totales	MA.86	< 10	
			Mohos y levaduras	MA.89	<100	
			E. Coli	MA.86	Ausencia	
			Salmonella spp.*@	MA.101/102	Ausencia	
			Staphylococcus aureus	MA.87	<100	

# PLANTA ENVASADO DE GRASAS

Muestra	Frecuencia de muestreo	Lugar	Características a medir	Método de análisis	Especificación	Responsable
Materia Prima <sub>k</sub> Butter oil	Cada Lote	MQE Empaque	Aerobios mesófilos REP	MA.88	Máx 1 x 10 <sup>4</sup> UFC/g	M I C R O B I O L O G O
			Coliformes totales	MA.86	< 1 x 10 <sup>1</sup> UFC/g	
			Mohos	MA.89	< 1 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	
			Levaduras	MA.89	< 1 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	
			E. Coli	MA.86	Ausencia	
			Staphylococcus aureus	MA.87	< 1 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	
Materia Prima entera <sup>n</sup> Leche	Cada Lote	MQE Empaque	Aerobios mesófilos REP, ufc/g	MA.88	5 x 10 <sup>3</sup> UFC/g	
			Enterobacterias, ufc/g	MA.96	ausencia	
			Mohos, levaduras	MA.89	< 1 x 10 <sup>1</sup> UFC/g	
			Salmonella spp.*@	MA.101/102	Ausencia	
			Staphylococcus aureus	MA.87	1 x 10 <sup>1</sup> UFC/g	

\* <sup>b</sup> NTE INEN 1108: 2011 Agua Potable: Requisitos.

\* <sup>c</sup> Norma Oficial Mexicana.NOM-093-SSA1-1994

\*<sup>d</sup> Recopilación normas microbiológicas de alimentos y asimilados y otros parámetros físico químicos de interes sanitario. Junio 2010  
Sistema de climatización. Norma UNE 100012. Enero 2005. Página 35.

\*<sup>e</sup> Recopilación normas microbiológicas de alimentos y asimilados y otros parámetros físico químicos de interes sanitario. Junio 2010  
Peter Snyder. Congreso celebrado en Victoria-Gasteiz 1995. Página 35.

\* <sup>m</sup> NTE INEN 276:2005 Margarinas de mesa: Requisitos.

\* <sup>m</sup> NTE INEN 2184:1998 Margarinas industrial: Requisitos.

\* <sup>n</sup> FTM. 3001016. Suero de leche. LA FABRIL S.A Manta

\* <sup>l</sup> FTM.3001031. Butter oil. LA FABRIL S.A. Manta.

\*\* Para los ensayos de *Cryptosporidium*, *Giardia Lamblia* la frecuencia de muestreo es dos (2) veces al año }

- 47 -

\*\*\*Seguimiento anual de 2 lotes de producto terminado.

\*@ Seguimiento anual de dos (2) muestras de productos recibidos

## SERVICIOS GENERALES

Muestra	Frecuencia de muestreo	Lugar	Características a medir	Método de análisis	Especificación	Responsable
Agua Industrial <sup>b</sup>	Mensual	Pileta envasado, Comedor Multiusos, Comedor Principal.	Coliformes fecales	MA.85	Ausencia/100 ml *	M I C R O B I O L O G O
Superficies inertes <sup>c</sup>	Mensual	Comedores	Aerobios mesófilos	MA.80 / MA. 88	< 400 UFC/cm <sup>2</sup> *	
			Coliformes totales	MA.81 / MA.86	< 200 UFC/cm <sup>2</sup>	
Superficies inertes <sup>e</sup>	Mensual	Baños	Aerobios mesófilos	MA.80 / MA. 88	Limpio: 2 - 10 UFC/cm <sup>2</sup> *	
			Coliformes totales	MA.81 / MA.86	Aceptable: 10 - 100 UFC/cm <sup>2</sup> * Sucio: > 100 UFC/cm <sup>2</sup> *	
Ambiente y/o Calidad de aire <sup>d</sup>	Por requerimiento	Vestidores	Recuento total de microorganismos (Aerobios mesófilos)	MA.91	< 8 x 10 <sup>2</sup> UFC/m <sup>3</sup> *	

\* <sup>b</sup> NTE INEN 1108: 2011 Agua Potable: Requisitos.

\* <sup>c</sup> Norma Oficial Mexicana.NOM-093-SSA1-1994

\*<sup>d</sup> Recopilación normas microbiológicas de alimentos y asimilados y otros parámetros físico químicos de interés sanitario. Junio 2010  
Sistema de climatización. Norma UNE 100012. Enero 2005. Página 35.

\*<sup>e</sup> Recopilación normas microbiológicas de alimentos y asimilados y otros parámetros físico químicos de interés sanitario. Junio 2010  
Peter Snyder. Congreso celebrado en Victoria-Gasteiz 1995. Página 35.

# PLANTA HOGAR Y CUIDADO PERSONAL HCP

Muestra	Frecuencia de muestreo	Lugar	Características a medir	Método de análisis	Especificación	Responsable
Ambiente y/o Calidad de aire <sup>d</sup>	Semanal	Línea 3	Recuento total de microorganismos (Aerobios mesófilos)	MA.91	< 5 x 10 <sup>2</sup> UFC/m <sup>3</sup> *	M I C R O B I O L O G O
		Línea 2				
		Línea Líquidos				
		Línea 4				
		Línea 5				
Ambiente y/o Calidad de aire <sup>d</sup>	Por requerimiento	MEJ 1	Recuento total de microorganismos (Aerobios mesófilos)	MA.91	< 5 x 10 <sup>2</sup> UFC/m <sup>3</sup> *	
		MEJ 2				
		MEJ 3				
Agua Ablandada	Semanal	Laboratorio Control de Calidad HCP	Aerobios mesófilos	MA.83	Máx 10 UFC/ ml	
			Pseudomonas aeruginosas	MA. 100	Ausencia/100 ml	
			Coliformes totales	MA.84	Ausencia /100 ml	
			Coliformes fecales	MA.85	Ausencia/100 ml	
Agua desmineralizada	Semanal	Línea Líquidos	Aerobios mesófilos	MA.83	Máx 10 UFC/ ml	
			Pseudomonas aeruginosas	MA,100	Ausencia/100 ml	
			Coliformes totales	MA.84	Ausencia /100 ml	
			Coliformes fecales	MA.85	Ausencia/100 ml	
Superficies vivas (Manos del personal) <sup>c</sup>	Quincenal	Sala envasado	Aerobios mesófilos	MA.80	Satisfactorio: < 3 x 10 <sup>3</sup> UFC*	
			Coliformes totales	MA.86	< 10 x 10 <sup>1</sup> UFC*	

## PLANTA HOGAR Y CUIDADO PERSONAL HCP

Muestra	Frecuencia de muestreo	Lugar	Características a medir	Método de análisis	Especificación	Responsable
Cosméticos ***	Lote	MQJ	Aerobios mesófilos	MA.104	< 190	M I C R O B I O L O G O
			E. coli		Ausencia	
			Mohos y levaduras		< 10	
			Pseudomonas aeruginosas		Ausencia	
			Staphylococcus aureus		Ausencia	
Insumos Body Care**	Lote	MQJ	Aerobios mesófilos	MA.104	< 100	
			E. coli		Ausencia	
			Mohos y levaduras		< 10	
			Pseudomonas aeruginosas		Ausencia	
			Staphylococcus aureus		Ausencia	

\*<sup>c</sup> Norma Oficial Mexicana.NOM-093-SSA1-1994

\*<sup>d</sup> Recopilación normas de los alimentos y asimilados y otros parámetros físico químicos de interes sanitario. Junio 2006.

\*\*Matriz de insumo body care (I+D Personal care)

\*\*\* Especificaciones producto terminado I+D.

## **CAPÍTULO 2**

### **Marco Teórico**

#### **2.1 Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL)**

Las buenas Prácticas de Laboratorio tienen como objetivo:

- Asegurar la calidad de los resultados.
- Implementar conformidad de todos los métodos aplicados por el laboratorio
- Mantener la seguridad en todo momento.

Los Principios de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), tal como fueron adoptados por la OCDE en 1981, proporcionan pautas recomendadas para la gestión de ensayos de una amplia variedad de estudios realizados con fines reglamentarios u otros fines.

Las Buenas Prácticas de Laboratorio es un Sistema de Calidad relacionado con los procesos organizativos y las condiciones bajo las

cuales los estudios no clínicos de seguridad sanitaria, alimentación y medioambiental son planificados, realizados, controlados, registrados archivados e informados.

La organización debe mejorar continuamente la eficacia de su sistema de gestión mediante el uso de la política y objetivos de la calidad, los resultados de las auditorías, el análisis de los datos, las acciones correctivas y preventivas y la revisión por la dirección

En los sistemas de calidad y en general en los sistemas de aseguramiento, lo que se busca es que los laboratorios cumplan con los requisitos mínimos necesarios para asegurar que los resultados ofrezcan confiabilidad y que las técnicas y/o ensayos utilizados sean realizados de manera correcta, hecho que minimiza totalmente las posibilidades de error. Como consecuencia se obtienen procesos controlados que conllevan a resultados con calidad.

Los laboratorios de análisis tienen como objetivo principal reportar resultados altamente confiables; por eso deben controlar y asegurar la calidad de sus resultados, entendiéndose calidad, como el conjunto de

propiedades y características óptimas de un producto o servicio que prueban su actitud para satisfacer necesidades específicas e implícitas.

En el Laboratorio de Microbiología, el personal debe:

- El laboratorio es un lugar de trabajo y un área de acceso restringido.
- Trabajar con calma y concentración.
- Lavarse las manos al entrar y salir del laboratorio.
- Mantener siempre muy organizada el área de trabajo.
- Utilizar siempre el mandil o bata en el lugar de trabajo.
- Llevar el pelo siempre recogido.
- Los microorganismos deben manejarse siempre alrededor de la llama del mechero o en una campana de seguridad biológica.
- Se debe leer la etiqueta y consultar la ficha de datos de seguridad de los medios de cultivos antes de su utilización
- Comprobar el correcto etiquetado de los medios de cultivos que se reciben en el laboratorio.

- Trabajar siempre con los sistemas de extracción y renovación mecánica de aire conectados.
- Utilizar siempre los Equipos de Protección Individual que se requiera, como mínimo protección ocular (gafas) y guantes tipo látex.
- Comprobar que los reactivos que se van a utilizar no estén caducados.
- Guardar los tubos de ensayo con tapa y en gradillas.
- Desconectar los equipos y cortar el suministro de agua corriente al finalizar la actividad.
- Utilizar una correcta señalización dentro del laboratorio.
- Recoger los frascos de reactivos, materiales y útiles de trabajo al acabar de utilizarlos.
- Al terminar las labores cerciőrese de que la cristalería haya sido lavada con abundante agua y nunca se usara la fregadera, papelera o basura común para deshacerse del material contaminado. Los desechos contaminados deberán ser esterilizados en el laboratorio antes de procesarlos como residuos.

En el Laboratorio de Microbiología, el personal no debe:

- No use pulseras, relojes, anillos y demás prendas que puedan enredarse con los equipos o propiciar accidentes.
- Llevar el pelo suelto y/o flequillos largos sin recoger.
- Trabajar en solitario en el laboratorio, especialmente en operaciones con riesgo.
- Fumar, comer, o beber.
- Usar recipientes de laboratorio para contener bebidas o alimentos
- Bajo ningún concepto debe sacarse ninguna muestra contaminada del laboratorio.
- Llevar lentes de contacto.
- Reutilizar los envases para otros productos sin retirar la etiqueta original.
- No se debe pipetear ni probar sustancias con la boca.
- Llenar demasiado los tubos de ensayo.
- Llevar tubos de ensayo en los bolsillos.

## **2.2 Norma ISO/IEC 17025**

La ISO (Organización Internacional de Normalización) e IEC (Comisión Electrotécnica Internacional) forman el sistema especializado para la normalización mundial. Los organismos nacionales miembros de ISO e IEC participan en el desarrollo de las Normas Internacionales a través de comités técnicos establecidos por la organización respectiva, para tratar con campos particulares de la actividad técnica. En el campo de la evaluación de la conformidad, el Comité de ISO para la evaluación de la conformidad (CASCO) es responsable del desarrollo de Normas y Guías Internacionales.

Las Normas Internacionales se redactan de acuerdo con las reglas establecidas en la Parte 2 de las Directivas ISO/IEC.

Con la publicación de la ISO/IEC Guía 25 en 1978 se trató en un principio de estandarizar las actividades de los laboratorios de ensayo y calibración, y aunque fue revisada en 1993, en Europa la ISO Guía 25 no tuvo aceptación, y en su lugar estuvo en vigor la EN 45001 como norma

para reconocer la competencia de los laboratorios de ensayos y calibraciones.

Posteriormente la ISO inició en 1995 los trabajos de revisión de la ISO Guía 25 por medio del Working Group (WG 10) de la ISO/CASCO (Committee on Conformity Assessment). De dicha revisión resultó la norma ISO/IEC 17025 - Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración, oficialmente datada de diciembre de 1999 y publicada internacionalmente a principios del año 2000.

Según una publicación realizada por Benjamín Valle y Galdino Guttman Bicho (en la Revista Metrología Instrumentação - Laboratorios & Controle de Processos de abril del 2001) la ISO/IEC 17025 fue producida como resultado de una amplia experiencia en la puesta en práctica de la ISO Guía 25 y de la EN 45001, que son canceladas y substituidas a fin de que se utilicen textos idénticos en los niveles internacional y regional. Ella establece los criterios para los laboratorios que desean demostrar su competencia técnica, que poseen un sistema de calidad efectivo y que son capaces de producir resultados técnicamente válidos. Los principales objetivos de la 17025 son:

- ✓ Establecer un patrón internacional único para testificar la competencia de los laboratorios para realizar ensayos y/o calibraciones, incluyendo muestreo. Tal patrón facilita el establecimiento de acuerdos de reconocimiento mutuo entre organismos de acreditación nacionales.
- ✓ Facilitar la interpretación y la aplicación de los requisitos, evitando, lo máximo posible, opiniones divergentes y conflictivas. Al incluir muchas notas que prestan aclaraciones sobre el texto, ejemplos y orientaciones, la 17025 reduce la necesidad de documentos explicativos adicionales.
- ✓ Extensión del alcance en relación a la ISO Guía 25, abarcando también muestreo y desarrollo de nuevos métodos.
- ✓ Establecer una relación más estrecha, clara y sin ambigüedad con las normas ISO 9001:1994 y 9002:1994.

Posteriormente con la publicación de la Norma ISO 9001:2000 que reemplaza la ISO 9001:1994 y 9002:1994, la ISO/IEC 17025 tubo que alinearse en la medida que fue necesario a la luz de la nueva edición de la Norma ISO 9001:2000 y por lo cual aparece la segunda edición de la

ISO/IEC 17025, integrado requisitos tal como el de la mejora continua. Por lo tanto los laboratorios de ensayo y de calibración que cumplen con la norma ISO/IEC 17025:2005 funcionarán, también de acuerdo con la Norma ISO 9001:2000

### **2.3 Validación de los Métodos Microbiológicos**

La Validación es un Procedimiento para establecer por medio de estudios de laboratorios una base de datos que demuestren científicamente que un ensayo analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas.

La norma ISO/IEC 17025 recoge, en su apartado 5.4.5 (dentro del apartado 5.4 de Métodos de ensayo y calibración y validación de métodos), los siguientes elementos:

5.4.5.1 La validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.

5.4.5.2 El laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto. La validación debe ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las necesidades del tipo de aplicación o del campo de aplicación dados. El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y una declaración sobre la aptitud del método para el uso previsto.

5.4.5.3 La gama y la exactitud de los valores que se obtienen empleando métodos validados (por ejemplo, la incertidumbre de los resultados, el límite de detección, la selectividad del método, la linealidad, el límite de repetibilidad o de reproducibilidad, la robustez ante influencias externas o la sensibilidad cruzada frente a las interferencias provenientes de la matriz de la muestra o del objeto de ensayo) tal como fueron fijadas para el uso previsto, deben responder a las necesidades de los clientes.

Ningún laboratorio pone en duda la necesidad de validación cuando el método es nuevo (resultado de un desarrollo realizado en el laboratorio).

Esa necesidad es discutida cuando el laboratorio está utilizando métodos oficiales o publicados en normas, que en “todos” los casos están supuestamente validados.

Las preguntas que se nos deben hacer son: si el método está validado, ¿está validado el laboratorio para llevarlo a cabo con satisfacción? y ¿Cuáles son las características - parámetros de validación – del método?

Las respuestas nos llevarán a dos situaciones posibles:

Efectivamente, el método publicado establece una serie de parámetros de validación, que son el resultado de la aplicación del método en uno o varios laboratorios con un determinado nivel de experiencia y medios (la mayoría de las veces desconocidos). En este caso, el laboratorio deberá asegurarse de que es capaz de demostrar que cumple dichos parámetros si los quiere utilizar como propios, para lo que deberá llevar a cabo un diseño experimental adecuado que valide al laboratorio.

O (y éste es, generalmente, el caso de algunos métodos oficiales) el método no proporciona ninguna información sobre sus límites de aplicación. Esta situación de desconocimiento no permite al laboratorio asegurar que tiene el método bajo control si no realiza una validación apropiada.

Finalmente, se debe tener claro que la validación es una actividad continua que se alimenta, fundamentalmente, de los datos que se obtienen de las actividades que se realizan en el terreno de la calibración y del control de calidad. Puede llegar el caso de que, como resultado de esta actividad continuada, sea necesario cambiar los límites de aplicación del método.

### **2.3.1 Tipos de Validación según sus objetivos**

#### *a) Validación Primaria*

La validación primaria es un estudio en el cual se recopila toda la información necesaria para luego proceder a la validación de los métodos. Es un proceso exploratorio cuyo objetivo es el establecimiento

de los límites operativos y las características de funcionamiento de un método.

Es conveniente que la validación primaria aporte las siguientes especificaciones, en cuanto a microbiología:

- Identificación morfológica del microorganismo objetivo
- Instrucciones relativas a las condiciones de incubación (temperatura, tiempo, atmósfera gaseosa, humedad) y las características del medio (pH, estabilidad)
- Una instrucción relativa a los límites de trabajo en términos de números de colonias o de placas por detector (placa, filtro de membrana)
- Si es posible, expresiones de la incertidumbre dentro de los límites fiables especificados
- Rango de aplicación y limitaciones

b) Validación Secundaria

Llamada también verificación, tiene lugar cuando un laboratorio pone en marcha un método desarrollado por otros. La validación secundaria tiene como objetivo principal recopilar los datos que permitan demostrar que el laboratorio es capaz de cumplir las especificaciones establecidas en la validación primaria. Actualmente dichas especificaciones no están disponibles para la mayoría de los métodos.

### **2.3.2 Parámetros Microbiológicos para la Validación de una técnica o método**

Se emplea los parámetros de la ENAC porque es la **Entidad Nacional de Acreditación** es el organismo español designado por la Administración para establecer y mantener el sistema de acreditación a nivel nacional, de acuerdo a normas internacionales, siguiendo en todo momento las políticas y recomendaciones establecidas por la Unión Europea.

**ENAC** es una organización declarada de utilidad pública, independiente y sin ánimo de lucro, auspiciada y tutelada por la Administración, que desarrolla su misión con una clara vocación de servicio público, dirigido tanto a la Administración como al mercado en general, garantizando que todas sus actuaciones se basan en principios de imparcialidad, independencia y transparencia, con un marcado carácter técnico, aportando valor a todos los agentes que tienen intereses en los distintos aspectos de la acreditación

**Su misión** es evaluar la competencia técnica de los organismos de evaluación de la conformidad- Laboratorios, Entidades de Inspección, de Certificación, Verificadores- para generar así confianza en sus actividades a la Administración, al mercado y a la sociedad en general.

De esta forma consigue que sus servicios estén reconocidos y aceptados nacional e Internacionalmente, contribuyendo así a una mayor protección de las personas y del medioambiente y al aumento de la competitividad de los productos y servicios españoles.

Para los análisis microbiológicos de acuerdo con ENAC los métodos de análisis microbiológicos cualitativos y cuantitativos deben ser validados estimando, cuando sea apropiado, los parámetros de desempeño que se indican en el cuadro siguiente, utilizando métodos estadísticos apropiados.

Propósito del Ensayo/ Parámetros del Método	Análisis Cualitativo	Análisis Cuantitativo
---	----------------------	-----------------------

Exactitud relativa	+	+
Repetibilidad	+	+
Reproducibilidad	+	+
Sensibilidad	+	-
Desviación positiva	+	+
Desviación negativa	+	+
Especificidad	+	+
Límite de detección	-	+
Límite de cuantificación	+	-
Efecto matricial	+	+

NOTA:

(-) Significa que este parámetro normalmente no se evalúa.

(+) Significa que este parámetro normalmente se evalúa.

*a) Selectividad*

La selectividad es el grado en que un método puede cuantificar el analito con precisión en presencia de interferentes. Idealmente la selectividad debería evaluarse para todos los interferentes importantes susceptibles de estar presente. Es de especial importancia comprobar los interferentes capaces de responder a la prueba de acuerdo con sus principios. En muchos tipos de análisis la selectividad es esencialmente un estudio

cualitativo basado en la significación, o bien un conjunto de pruebas pertinentes de interferencias.

*b) Especificidad*

Es la capacidad del método para diferenciar precisa y específicamente el compuesto de interés, en presencia de los demás componentes, que se espera estén presentes en la matriz de la muestras. Estos componentes pueden ser precursores de la síntesis o subproductos de la misma, impurezas, excipientes o productos de degradación.

La especificidad se define como la proporción de muestras negativas (no reactivas) correctamente identificadas.

Nota. La especificidad puede ser afectada por la presencia de interferentes como precursores de síntesis, impurezas y productos de degradación, entre otros. En microbiología, especificidad se define como la fracción del número total de cultivos o colonias negativas que son asignados correctamente con el método utilizado. (ISO/TR13843).

*c) Linealidad*

Capacidad de un método analítico para generar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito o valor del parámetro de la muestra, dentro de un rango.

La linealidad determina la región de la curva de cuantificación en que hay relación directa entre la señal instrumental y la concentración del producto analizado, siendo un método lineal cuando presenta una  $r > 0.99$

Un método de análisis presenta regresión lineal, cuando al aplicar un método se obtienen las respuestas, las cuales directamente o después de transformaciones matemáticas son proporcionales a la concentración del compuesto analizado dentro de un intervalo de concentraciones apropiadas. Su aplicación principal está en curvas de calibración.

#### *d) Precisión*

Se relaciona con la dispersión de la medida alrededor de un valor medio o central y mide la concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidas veces a muestras separadas e idénticas, obtenidas del mismo lote de material homogéneo.

Mide el grado de cercanía entre las medidas obtenidas de análisis realizados repetidamente de múltiples muestreos de unas muestras homogéneas. La precisión se mide por la dispersión que puede ser expresado como desviación estándar o coeficiente de variación (desviación estándar relativa)

La precisión de un método comprende:

**Repetibilidad** Medida de la precisión del método cuando este se realiza por el mismo analista, el mismo día, mismo reactivos, mismo instrumento (precisión dentro del ensayo).

**Reproducibilidad** Esta se mide cuando el ensayo se realiza en diferentes laboratorios por diferentes analistas, diferentes días, diferentes instrumentos (precisión entre laboratorios). El grado de reproducibilidad se determina en función de las variables de ensayo. La reproducibilidad puede ser comparada con la precisión del análisis en condiciones normales obteniéndose así una medida de la solidez del método.

En conclusión, la reproducibilidad, es la concordancia entre resultados obtenidos de diferentes laboratorios o por diferentes experimentadores usando las mismas metodologías y trabajando con muestras idénticas.

e) Solidez y Robustez

La evaluación de solidez puede ser considerada durante la fase de desarrollo y depende del tipo de procedimiento de estudio. Busca demostrar la veracidad de un análisis con respecto a variaciones deliberadas en parámetros del método, se evalúa la capacidad del resultado de no sufrir alteraciones por pequeñas modificaciones en los parámetros de análisis.

La robustez en un método es finalmente, el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos para las mismas muestras bajo variadas condiciones (diferentes experimentadores, diferentes lotes de reactivos). Se realiza un diseño experimental con varios factores y se aplica análisis de varianza.

f) Exactitud

Se define como el grado de concordancia o como la diferencia entre la media de los resultados del ensayo obtenidos por el método y el valor

verdadero o el valor aceptado como correcto para la cantidad medida. Se conoce también como error sistemático o sesgo.

Es una medida de la diferencia entre el promedio de los resultados del análisis y el valor verdadero; de allí se puede establecer un error promedio. Mide el grado de similitud entre los resultados del método evaluado y los obtenidos usando un método de referencia.

*g) Estabilidad*

Se considera adecuada si la desviación estándar relativa calculada en los resultados obtenidos en diferentes intervalos de tiempo, no excede el 20% del valor correspondiente de la precisión del sistema.

*h) Limite de detección*

Es un numero expresado en unidades de concentración (o cantidad) que describe el más bajo nivel de concentración de un analito que puede determinarse como estadísticamente diferente del blanco analítico.

El límite de detección es la cantidad o concentración de analito más pequeña en la muestra de prueba que puede distinguirse fiablemente de cero. En los sistemas analíticos donde el rango de validación no lo

incluye o no se le aproxima, no es preciso que el límite de detección forme parte de la validación.

*i) Límite de Cuantificación*

Corresponde a la más baja cantidad del analito que puede determinarse cuantitativamente con precisión y exactitud aceptables.

Es la concentración del analito que produce una señal más grande que el blanco y que puede ser detectada dentro de los límites aceptados por los laboratorios.

*j) Sensibilidad*

Es definida como la proporción de muestras positivas o reactivas correctamente identificadas por la prueba empleada.

La sensibilidad es entendida como la capacidad del método de distinguir, con determinado nivel de confianza, dos concentraciones próximas.

## **2.4 Métodos de Ensayo Microbiológicos**

El control de calidad es importante tanto en salud pública como en la industria. Con el desarrollo de técnicas microbiológicas de diagnóstico, ha sido posible realizar un control apropiado de las características de inocuidad. La validación sirve como soporte de aseguramiento de la calidad en los laboratorios brindando confianza y solidez a los resultados emitidos por el mismo.

Los laboratorios de análisis tienen como principal objetivo reportar resultados altamente confiables, por eso deben controlar y asegurar la calidad de los resultados, entendiéndose calidad, como el conjunto de propiedades y características óptimas de un producto o servicio que prueban su actitud para satisfacer necesidades específicas e implícitas. El mejoramiento de la calidad en el laboratorio consiste en implementar un programa completo que es el resultado final emitido por el laboratorio proporcionando resultados útiles. Este mejoramiento, nosolo incluye los conceptos más tradicionales de control de calidad, como el mejoramiento y la evaluación externa de la calidad que tiene como propósito mantener en cualquier proceso un rendimiento a niveles aceptables según los

estándares, sino que también incluye el mejoramiento continuo de la calidad bajo el concepto de “calidad total”

El control de calidad abarca en los laboratorios de Microbiología el monitoreo de medios de cultivo, reactivos, equipos y/o instrumentos, validación de procedimientos técnicos y del personal. Por lo tanto, la validación de las pruebas microbiológicas es de vital importancia ya que por medio de esta se busca determinar las variaciones entre ensayos para disminuir las posibilidades de error en los resultados, haciéndolos de esta forma reales y confiables. Así mismo se busca garantizar que las técnicas son compatibles con las condiciones en las que se está trabajando.

El análisis microbiológico tiene como fin proporcionar información confiable acerca de la inocuidad y calidad sanitaria de una muestra cualquiera. El laboratorio debe utilizar los métodos de ensayo que satisfagan la necesidad del cliente y que sean apropiados para los ensayos que realiza. Se deben aplicar métodos y procedimientos apropiados para todos los ensayos dentro de su alcance (incluye muestreo, manipulación, transporte, almacenamiento, preparación de la muestras a ensayar, estimación de la incertidumbre y empleo de técnicas estadísticas para el análisis de datos de ensayo). El laboratorio puede utilizar métodos

oficiales, métodos normalizados nacionales e internacionales, o métodos internos desarrollados por el mismo.

En las pruebas de diagnóstico microbiológicos tanto para alimentos, como para aguas, el recuento en placa en profundidad es una técnica comúnmente utilizada para determinar el número de células viables.

La validación y verificación de esta técnica es importante para que el laboratorio pueda elaborar, desarrollar y generar resultados confiables y seguros, como requisitos parciales para dar cumplimiento a las normas oficiales vigentes tales como la ISO-IEC 17025.

#### **2.4.1 Métodos de Ensayos Microbiológicos Cualitativos**

Son métodos en los que el resultado se expresa en términos de ausencia/presencia.

Los procedimientos de confirmación e identificación del microorganismo, deben ser validados estimando, cuando sea apropiado, su especificidad, exactitud relativa, desviación positiva, desviación negativa, límite de detección, efecto matricial, repetibilidad y reproducibilidad.

Las diferencias debidas a las matrices deben tenerse muy en cuenta al analizar diferentes tipos de muestras. Los resultados deben evaluarse utilizando métodos estadísticos apropiados.

#### **2.4.2 Métodos de Ensayos Microbiológicos Cuantitativos**

Debe considerarse la especificidad, sensibilidad, exactitud relativa, desviación positiva, desviación negativa, repetibilidad, reproducibilidad y el límite de cuantificación dentro de una variabilidad establecida y, en caso necesario, determinar cuantitativamente estos parámetros. Las diferencias debidas a las matrices deben tenerse en cuenta al analizar diferentes tipos de muestras. Los resultados deben evaluarse utilizando métodos estadísticos apropiados.

Un ensayo cualitativo no brinda una información numérica de los resultados, pero esto no implica que sea inferior a una prueba cuantitativa. Las aplicaciones de estos dos ensayos pueden ser diferentes y en algunas situaciones un resultado cualitativo es suficiente. Debe tenerse en cuenta que en muchos casos no existen materiales de referencia y en otros la naturaleza de los mecanismos de protección no son bien conocidos, lo que limita la cuantificación de los resultados o al menos su interpretación.

La validación analítica es uno de los elementos básicos en sistema de calidad. El hecho de validar trata de disminuir o controlar los factores que llevan a la imprecisión o inexactitud de un dato generado, a través de la realización de un trabajo analítico dentro de unos parámetros definidos. La validación de un método analítico provoca una mayor fiabilidad y aceptación de los datos generados, estando estas en proporción con la calidad del proceso de obtención de los mismos.

## 2.5 Requisitos Microbiológicos de las Margarinas

### REQUISITOS MICROBIOLÓGICOS

REQUISITOS	LIMITE MAXIMO	METODO DE ENSAYO
REP ufc/g. Recuento total de microorganismos aerobios mesófilos	$1,5 \times 10^4$	NTE INEN 1529-5
Coliformes totales ufc/g	$1,0 \times 10^1$	NTE INEN 1529-6
E. coli NMP/g	$<3,0 \times 10^0$ *	NTE INEN 1529-8
Mohos y levaduras upc/g	$1,0 \times 10^2$	NTE INEN 1529-10
Staphylococcus aureus ufc/g	$1,0 \times 10^2$	NTE INEN 1529-14
$<3,0 \times 10^0$ *, significa que no existirá ningún tubo positivo en la técnica del NMP con tres tubos		

## 2.6 Definiciones

**Analito:** Componente medido por medio de un procedimiento de análisis, puede ser el microorganismo, sus componentes o productos.

El analito microbiológico consiste en partículas discretas de vida, llamado de formas distintas como unidades formadoras de colonias (ufc), partículas formadoras de colonias (pfc), los gérmenes, propágulos, etc. El número de colonias observado es una aproximación del número de partículas vivientes.

**Cepas de referencia:** Microorganismos obtenidos de una colección nacional o internacional reconocida.

**Cepas de reserva:** Cepas idénticas obtenidas mediante un único subcultivo de una cepa de referencia.

**Cepas de trabajo:** Subcultivos de microorganismos obtenidos a partir de la cepa de reserva para ser utilizados en los ensayos que lo precisen.

**Coeficiente de variación:** Cociente entre la desviación típica y el valor absoluto de la media aritmética.

$$\%CV = \frac{S}{x} \times 100$$

**Desviación estándar (típica):** Es igual a la raíz cuadrada de la suma de las diferencias cuadráticas de las observaciones con respecto a la media dividido por el número de observaciones menos uno.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

**Desviación negativa:** Ocurre cuando el método da un resultado negativo siendo la muestra positiva. Esta desviación se convierte en un resultado falso negativo cuando puede demostrarse que el resultado verdadero es positivo.

**Desviación positiva:** Ocurre cuando el método da un resultado positivo siendo la muestra negativa. Esta desviación se convierte en un resultado falso positivo cuando puede demostrarse que el resultado verdadero es negativo.

**Detector de partículas:** Placa de medio sólida o un tubo de líquido que contiene un medio nutritivo para el conteo o la detección de vida de partículas microbianas.

**Eficiencia:** Fracción de colonias correctamente asignadas.

**Especificidad:** Fracción del número total de cultivos o colonias negativos que son asignados correctamente con el método utilizado.

**Exactitud:** Es la capacidad de un método de dar resultados lo más próximos posibles al valor verdadero, es decir el grado de acuerdo entre un resultado de ensayo y el valor de referencia aceptado. En microbiología normalmente se entiende como porcentaje de recuperación de un microorganismo frente al valor del inóculo en presencia de producto.

**Incertidumbre de medición:** Parámetro, asociado con el resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al mensurando.

**Incertidumbre de contar:** Desviación típica relativa de los resultados de las reiteradas recuento de las colonias o las partículas de la misma placa (s) o campo (s) en condiciones estipuladas.

**Incertidumbre estándar:** Incertidumbre del resultado de una medición expresada como una desviación estándar.

**Incertidumbre - Evaluación tipo A:** Método de evaluación de la incertidumbre por el análisis estadístico de una serie de observaciones.

**Incertidumbre - Evaluación tipo B:** Método de evaluación de la incertidumbre por medios distintos al análisis estadístico de series por ejemplo, observaciones asumidas a partir de distribuciones de probabilidad basado en la experiencia u otra información.

**Inocular:** Introducir en un medio o matriz una sustancia que contiene un microorganismo.

**Media aritmética:** Es igual a la suma de todas las observaciones dividida por el número de ellas.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

**Microorganismo:** Nombre genérico que designa los seres solo visibles al microscopio, p.e. las bacterias, los infusorios, las levaduras, etc. Los microorganismos pueden vivir aislados o agruparse formando colonias.

**Microorganismos diana (Target):** Son los microorganismos objetivos del ensayo a validar, apropiados al método y al producto alimenticio. Las categorías de un grupo diana son:

- ✓ Un grupo no definido por ejemplo recuento total, Coliformes, levaduras, bacterias de ácido láctico;
- ✓ Una familia por ejemplo Enterobacteriaceae;
- ✓ Un género por ejemplo Salmonella, Listeria;
- ✓ Una especie por ejemplo Listeria monocytogenes, Escherichia coli;
- ✓ Una cepa por ejemplo Salmonella enteritidis fagotipo 4.

**Microorganismos no diana (Target):** Son aquellos microorganismos que deben ser negativos y son empleados para establecer reactividad cruzada.

**Muestra:** Es una cantidad representativa (propiedades de la muestra idénticas a la de la población) y estable (propiedades de la muestra

inalterables desde su obtención hasta la realización del ensayo), subconjunto de una población, que se obtiene para determinar en ella los valores de ciertas propiedades, que posteriormente se utilizan para realizar inferencias respecto a las propiedades de la población de la que se obtiene la muestra.

**SET de detección:** Combinación de placas o tubos en los que la estimación cuantitativa de la concentración de microorganismos en una muestra se basa.

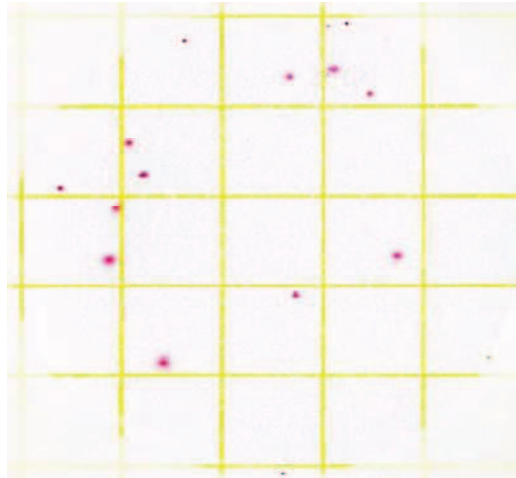
**Ufc:** Unidad formadora de colonia.

**Petrifilm:** Las placas comerciales petrifilm se han diseñado para el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en muestras de agua y alimentos. Consiste en laminas delgadas con un medio de cultivo y un agente solidificante soluble en agua. Además, pueden estar recubiertas por una película de polipropileno para atrapar el gas producido por algunas bacterias. También tienen incorporado indicadores de pH que colorean las colonias para facilitar su identificación, así como una cuadrícula para hacer el recuento de la UFC. Se han diseñado placas para recuento aeróbico, de Coliformes, Escherichia coli, mohos y levadura.

La Placa PetrifilmMR para Recuento de Aerobios Totales (Aerobic Count AC) es un sistema de medio decultivo listo para ser empleado, que contiene nutrientes del Agar Standard Methods, un agente gelificante soluble en agua fría y un tinte indicador que facilita la enumeración de las colonias. Las Placas Petrifilm recuentos de aerobios AC se utilizan en la enumeración de la población total existente de bacterias Aerobias en productos, superficies, etc.

**Aerobios mesófilos:** Microorganismos aerobios mesófilos son aquellos microorganismos que se desarrollan en presencia de oxígeno libre y a una temperatura comprendida entre 20°C y 45°C con una zona óptima entre 30°C y 40°C.

REP es el recuento de microorganismos aerobios mesófilos por gramo o centímetro cúbico de muestra de alimento.

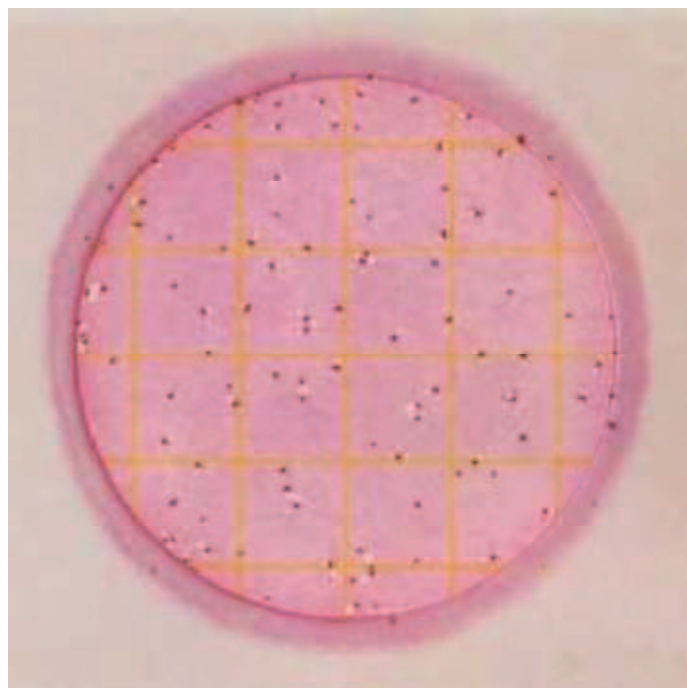


**COLIFORMES TOTALES:** Los Coliformes totales, son un grupo de microorganismos que comprenden varios géneros de la familia de las entero bacterias entre las que se destaca la *Escherichia coli* que a su vez es perteneciente a los Coliformes termo tolerante siendo el más reconocido representante, de contaminación de alimentos por origen fecal, por lo que es el principal indicador de higiene en alimentos.

Este grupo de microorganismo se caracteriza por estar ampliamente difundido en el agua y suelo y es habitante normal del tracto intestinal de la mayoría de animales de sangre caliente incluye el hombre.

Son bacterias de morfología bacilar, gran negativas aerobias y anaerobias facultativas, oxidasa negativa, no esporogenas y son capaces de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas a 37°C en un tiempo máximo de 48 horas.

Las placas Petrifilm Coliformes Totales contienen los nutrientes del Violeta Rojo Bilis (VRB) modificado, un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador de tetrazolio que facilita la enumeración de colonias. El film superior atrapa el gas producido por la fermentación de la lactosa producida por los Coliformes.



## **CAPÍTULO 3**

### **Diagnostico del Laboratorio de Microbiología de la FABRIL**

#### **3.1 Ingreso al Laboratorio de Microbiología**

La entrada al laboratorio de microbiología estará restringida al personal que realiza los análisis y las tareas auxiliares en el laboratorio y al personal relacionado con el manejo de las muestras microbiológicas.

No se permitirá el ingreso al laboratorio de personas ajenas a dichas tareas. Las personas ajenas a dichas tareas que ingresen, deben:

- ✓ Leer detenidamente las disposiciones generales indicadas en el cuadro titulado Buenas Prácticas de Laboratorio de Microbiología.
- ✓ Usar los EPP “Uso de elementos de protección personal” antes del ingreso al Laboratorio de Microbiología.

- ✓ Registrar la fecha, la hora de ingreso y salida, nombre y apellido, motivo de ingreso y firma, en la plantilla “Personal que ingresa al Laboratorio de Microbiología”.

Estas restricciones son necesarias para reducir al mínimo la introducción de polvo y otros contaminantes en el laboratorio. Además, las muestras pueden contener microorganismos patógenos que constituyen un riesgo de salud del personal no autorizado, el cual no suele estar familiarizado con las medidas de seguridad contra los riesgos biológicos.

### **3.2 Nivel de Bioseguridad**

El laboratorio de microbiología de acuerdo al criterio de clasificación de los microorganismos infecciosos por grupo de riesgo (Organización Mundial de la Salud, OMS) se encuentra en el Grupo de riesgo 2 (riesgo individual moderado, riesgo poblacional bajo) y el nivel de bioseguridad al que pertenece es el 2.

En la puerta de acceso al laboratorio se encuentra identificado con el símbolo y signo internacional de peligro biológico y el nivel de bioseguridad.

### **3.3 Técnicas microbiológicas apropiadas**

El siguiente código es una enumeración de las prácticas y actividades de laboratorio esenciales que constituyen la base de las técnicas microbiológicas apropiadas:

#### **Acceso**

- ✓ Sólo podrá entrar en las zonas de trabajo del laboratorio el personal autorizado.
- ✓ Las puertas del laboratorio se mantendrán siempre cerradas.
- ✓ No se autorizará ni permitirá la entrada de niños ni mujeres embarazadas en las zonas de trabajo del laboratorio.

#### **Prácticas de trabajo**

- ✓ Usar uniformes de laboratorio (Mandil) durante la permanencia en el laboratorio.
- ✓ Usar guantes protectores apropiados para todas las actividades que puedan entrañar contacto directo o accidental con materiales

potencialmente infecciosos. Una vez utilizados, los guantes se retirarán de forma aséptica y a continuación se lavarán las manos.

- ✓ El personal debe lavarse las manos después de manipular materiales infecciosos, así como antes de abandonar las zonas de trabajo del laboratorio.
- ✓ Cuando las actividades analíticas lo requieran, se deben usar gafas de seguridad, viseras u otros dispositivos de protección para proteger los ojos y el rostro de salpicaduras, impactos y fuentes de radiación ultravioleta artificial.
- ✓ No debe usar prendas protectoras fuera del laboratorio.
- ✓ Usar calzado con puntera.
- ✓ En las zonas de trabajo estará prohibido almacenar alimentos o bebidas para consumo humano, fumar, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto.
- ✓ La ropa protectora de laboratorio no se guardará en los mismos casilleros que la ropa de uso externo.
- ✓ Se utilizan gabinetes biológicos, u otros equipos de protección personal o dispositivos de contención física adecuados cuando se realicen prácticas de trabajo que puedan generar aerosoles o

salpicaduras infecciosas o se utilicen altas concentraciones de agentes infecciosos.

- ✓ Estará estrictamente prohibido pipetear con la boca.
- ✓ No se colocará ningún material en la boca ni se pasará la lengua por las etiquetas.

Todas las técnicas se practicarán de manera que se reduzca al mínimo la formación de aerosoles

Recepción de medios de cultivos comerciales, medios listos para usar, Petrifilm y reactivos

Para la recepción de medios de cultivos comerciales, medios listos para usar, Petrifilm y reactivos el laboratorio de microbiología solicita al proveedor el certificado de calidad de análisis del medio de cultivo comercial en polvo deshidratado, medios de cultivos listos para usar, Petrifilm ó reactivo.

Toda esta información se registra en una planilla de recepción de reactivos laboratorio de microbiología se registra con la fecha de ingreso, nombre del reactivo, lote, cantidad y proveedor.

Una vez registrada toda la información necesaria se etiqueta cada envase de medios de cultivos lo cual la etiqueta consta con la fecha de recepción del medio el lote, fecha de apertura del envase y el tipo de medio de cultivo o reactivo y el responsable de la elaboración.

Los medios de cultivos preparados y estériles pueden ser mantenidos en refrigeración, entre 2°C a 8°C, por no más de un mes a partir de su preparación.

Los medios de cultivo en cajas Petri y soluciones de reactivos preparados y almacenados en el refrigerador llevan colocado una etiqueta con los siguientes datos: una identificación, N° lote, condiciones de almacenamiento la fecha de preparación, fecha de vencimiento, el personal que los preparo y firma.

Para el caso de los medios de dilución en frascos estos llevan un ticket que indica la fecha de preparación.

El Laboratorio verifica que los medios de cultivo y diluyentes preparados cumplan los valores de pH establecidos por el fabricante e indicados en el envase y sus propiedades de esterilidad.

Los resultados del pH (después del proceso de esterilización) se registran en la plantilla de “Preparación de medios de cultivo y reactivos”.

Para comprobar la efectividad del proceso de esterilización de los medios de cultivo almacenados en el refrigerador y empleados para el monitoreo de calidad de aire y superficies de contacto se emplea el criterio indicado en los puntos 5.1.14.1 y 5.1.14.2 Norma INEN 1529-1.

Tomar al azar tres tubos o frascos e incubarlos 72 h a 30° C para medios líquidos y para medios sólidos tomar al azar tres tubos o frascos (cajas) e incubarlos 72 h a 30° C. Criterio de rechazo: si el medio líquido presenta evidencias de crecimiento, la prueba es positiva si el medio presenta desarrollo de colonias. No se deben utilizar los medios que den prueba positiva.

La persona encargada registra los resultados en la plantilla “Control de esterilidad de medios de cultivo y diluyentes”.

Los lotes de medios de cultivo preparados y empleados en los ensayos diarios como prueba de esterilidad se realizan un blanco, como criterio de aceptación no debe existir desarrollo de colonias. Este resultado se registra en la plantilla “Aseguramiento de calidad interno”.

El laboratorio de microbiología registra fecha de recepción, fecha de caducidad y fecha de apertura del envase de los medios de cultivo y reactivos en la plantilla “Manejo de Medios de cultivo y/o reactivos”

LA FABRIL S.A.		Manejo de medios de cultivo y/o reactivos			
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA					
Medio de cultivo y/o reactivo:		Lote:			
Fecha de recepción:		Fecha de caducidad:		Fecha de apertura del envase:	
Elaborado por:					

En los envases de medios de cultivos consta esta información. Los medios de cultivo comerciales polvos deshidratados son almacenados bajo condiciones prescritas en las fichas de seguridad. Bien cerrado.

Seco. De +15°C a +25°C. No deben utilizarse medios deshidratados que presenten apelmazamiento o un cambio de color.

Para Petrifilm conservar las bolsas sin abrir a < 8°C. Dejar que las bolsas lleguen a la temperatura ambiente antes de abrirlas. Devolver las placas sin usar a las bolsas. No refrigerar las bolsas abiertas a fin de evitar exponerlas a la humedad. Conservar las bolsas una vez cerradas en un lugar fresco y seco +25°C.

### **3.4 Eliminación de los reactivos**

Los envases vacíos de los reactivos utilizados por el Laboratorio son enviados al proveedor para que el gestione la correcta eliminación. La operación queda registrada en un correo interno el cual indica la cantidad de envases vacíos entregados al proveedor y tipo de reactivo.

En el laboratorio de microbiología se llevan inventarios de todos los medios de cultivos que ingresan, incluidos también a los materiales de vidrio y equipos que consta en el laboratorio.

Las muestras deben ser llevadas al Laboratorio por un trabajador designado para tal efecto dependiendo del Proceso de envasado, se reciben en tarrinas, en botellas o fundas correctamente rotuladas y esto dependerá del lugar de procedencia.

La rotulación del envase que contenga la muestra debe indicar: nombre de producto, lote.

Las muestras de productos especiales solicitadas por Innovación adjuntan el requerimiento de análisis donde se detallan los análisis microbiológicos requeridos.

El examen bacteriológico de las muestras de agua, se debe iniciar inmediatamente después de su recolección para evitar cambios impredecibles. Si la muestra no se puede procesar dentro de una hora después de la recolección, transportarla en contenedor isotérmico con gel refrigerante

La temperatura de toda muestra de agua debe ser inferior a 10°C durante un tiempo máximo de 6 horas de transporte. Estas muestras deben ser refrigeradas, una vez recibidas, en el Laboratorio procesadas en dos horas.

Se deberá registrar la temperatura del contenedor a la llegada del Laboratorio de Microbiología Registro “Recepción de muestras a ensayar”<sup>1</sup> con la finalidad de asegurar que las mismas hayan sido transportadas a la temperatura indicada. Las temperaturas superiores a 10° C invalidan las muestras para su análisis.

Las muestras de Margarinas de mesa e industriales, coberturas de chocolates, insumos, ingredientes y productos especiales se deben enviar al Laboratorio de Microbiología lo más rápido posible y en condiciones que reduzcan al mínimo la posibilidad de cambio de su calidad microbiológica y evitar que durante el transporte las muestras sean expuestas a la luz solar directa.

Manipular y empacar las muestras de modo que una manipulación posterior no pueda cambiar su identidad, ni sugerir ninguna duda acerca de su origen.

Se debe enviar las muestras al Laboratorio de Microbiología en su envase original, sin abrir para el caso de margarinas de mesa, coberturas de chocolates en presentaciones de 400g, 500g, 1kg y productos especiales.

El Laboratorio de Microbiología facilita los envases a los diferentes procesos de operaciones para la toma de muestras (margarinas y coberturas de chocolates industriales).

Todas las muestras envasadas, para su envío deben empacarse con materiales que puedan absorber los golpes para evitar que sufran daños durante el transporte.

### **3.5 Manipulación de las muestras**

La muestra recepcionada es etiquetada en su envase original por el Ayudante de Laboratorio Microbiología en el cual se detalla: el número asignado por el laboratorio, fecha de análisis, producto, procedencia, lote, turno, entregado por, recibido por. La preparación de la muestra a



Concluidos los ensayos las muestras de grasas, coberturas de chocolates, productos especiales, insumos e ingredientes son conservadas en un estante destinado e identificado en el cuarto de retención de muestras. La temperatura de almacenamiento es registrada dos veces en el día en la plantilla “Condiciones ambientales dealmacenamiento de muestras” y “Registro diario de temperatura”

Las condiciones óptimas de almacenamiento y conservación de los ítems ensayados son tomadas de las especificaciones internas de los productos. El tiempo de conservación de las muestras se establece en el siguiente cuadro:

<b>PRODUCTOS</b>	<b>TIEMPO RETENCION</b>
MARGARINAS INDUSTRIALES Y CONSUMO NACIONAL	12 SEMANAS
INGREDIENTES Y ADITIVOS	1 SEMANA
MUESTRAS DE CHOCOLATES	12 SEMANAS

### **3.6 Análisis de la Propuesta de Validación**

De acuerdo a lo expuesto el Laboratorio de microbiología de la FABRIL, cuenta con las fortalezas y competencias que lo caracterizan como un ente confiable para el control de la conformidad tanto de los productos como de los procesos que se llevan a cabo en las diferentes plantas de esta Industria.

Sin embargo es importante que se lleve a cabo un estudio de validación de los métodos que se realizan en el laboratorio de microbiología, de acuerdo a los criterios de las Buenas Prácticas de Laboratorio y de conformidad con lo establecido en la norma ISO/IEC 17025 (Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorio de Ensayo y Calibración), a fin de cumplir con requisitos aceptados internacionalmente, garantizar la veracidad y confiabilidad de los

métodos de ensayos, prepararse para una futura acreditación ante el OAE, y establecer controles de calidad para los ensayos microbiológicos.

En función de la factibilidad y el dominio de las técnicas, se considera adecuado realizar la primera validación de métodos microbiológicos a los ensayos para la determinación de Aerobios y Coliformes Totales en Margarinas, que se realizan de manera cotidiana en el laboratorio de Microbiología de la FABRIL.

## **CAPÍTULO 4**

### **Validación del Método de Ensayo para la Determinación de Aerobios en Margarinas**

#### **4.1 Necesidad Analítica**

En el laboratorio de microbiología de La Fabril S.A surge la necesidad de validar el método de ensayo para determinación de Aerobios mesófilos en margarinas para dar credibilidad y confianza a los resultados emitidos a sus diferentes clientes internos que le presta servicio a la organización. Debido a que el recuentos de microorganismo aerobios mesófilos refleja la calidad sanitaria de los productos analizados indicando, además de la condición higiénica de la materia prima, y la forma como fueron manipulados durante su elaboración.

#### **4.2 Método**

El método utilizado por el laboratorio de microbiología de la Fabril es el MA 409 Recuento de Aerobios. Método oficial 990.12 AOAC. Cuenta de Placa Aeróbica en Alimentos Método de Película Seca Rehidratable

### **4.3 Borrador del Procedimiento.**

#### **4.3.1 Definición y Alcance**

Las placas Petrifilm Recuentos de Aerobios constituye un sistema listo para usar que contiene los elementos nutritivos del P.C.A., un agente gelificante soluble en agua, y un indicador de tetrazolio que facilita la enumeración de colonias. Las placas Petrifilm Recuentos de Aerobios son útiles para la enumeración de bacterias aeróbicas en las industrias alimentarias y de productos lácteos, y están descontaminadas pero no son estériles.

Aplicable a muestras de margarinas de mesa e industriales.

#### **4.3.2 Materiales, Equipos y Reactivos.**

- ✓ Placas Petrifilm para recuentos de Aerobios.
- ✓ Aplicador de plásticos Petrifilm
- ✓ Pipetas
- ✓ Contador de colonias MASCC002CO2
- ✓ Incubadora MASCC002I03
- ✓ Tampón fosfato de Butterfield (tampón fosfato IDM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 0.0425 g/l , ajustar a pH 7.2)
- ✓ Agua de peptona al 0.1%
- ✓ Agua de peptona sal (método ISO 6887)
- ✓ Solución salina (0.85 – 0.90%)
- ✓ Caldo letheen sin tiosulfato y agua destilada

#### **4.3.3 PROCEDIMIENTO**

Use placas de cuenta aeróbica con película seca. Coloque la placa en una superficie plana; levante la película superior e inocule 1 ml de suspensión de prueba en el centro de la base de la película. Con cuidado desenrolle la película superior sobre el inóculo. Distribuya la suspensión de prueba sobre el área de crecimiento prescrita presionando en el centro del difusor (el lado hueco hacia abajo). No mueva la placa por un 1 minuto para permitir que el gel se solidifique. Incube las placas a  $48 \pm 2$  horas a  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Coloque las placas en posición horizontal en la incubadora, el lado limpio hacia arriba, en pilas que no excedan las 20 unidades. Cuente las placas justo después del periodo de incubación. Después de que la incubación se ha completado las placas deben almacenarse (congeladas) a  $\leq 15^\circ\text{C}$  por siete días. Lo anterior debe evitar como una práctica de rutina.

Use un contador de colonias estándar para contar, también se puede utilizar una lupa con luz para facilitar el conteo. Las colonias se manchan en varios tipos de rojo. Cuente las colonias en un rango contable (25-250 colonias). Para calcular la cuenta bacteriana, multiplique el número total de colonias por placa (o el número promedio de colonias por placa si

cuenta placas duplicadas de la misma dilución) por el recíproco de dilución utilizada.

Cuando cuente las colonias de placas duplicadas de diluciones consecutivas, calcule el número medio de las colonias para cada dilución antes de determinar la cuenta bacteriana promedio. Las cuentas calculadas pueden realizarse en placas con >250 colonias y deben ser reportadas como cuentas calculadas. Al hacer los recuentos de tal área de crecimiento circular se puede considerar que puede contener veinte cuadrados de 1 cm. Para identificación futura, levante la película superior y levante la colonia del gel.

#### **4.4 Identificación de las variables que intervienen en el método**

- ✓ Temperatura de incubación.
- ✓ Tiempo de incubación.
- ✓ Calibración de equipos.
- ✓ Esterilización de área.
- ✓ Esterilización de materiales.
- ✓ Esterilización de medios de cultivo.

- ✓ Fecha de caducidad de los medios de cultivo.
- ✓ Preparación de la muestra.

#### 4.4.1. Identificación de requisitos

<b>Equipos</b>	<b>U Calibración</b>	<b>K</b>	<b>Deriva</b>
Autoclave	SI	SI	SI
Balanza	SI	SI	SI
Cabina de flujo laminar	NO	NO	NO
Estufa	SI	SI	SI
Incubadora bacteriológica	SI	SI	SI
Control de temperatura de la Refrigeradora	SI	SI	SI
Contador de colonias	NO	NO	NO
Pipeta Automática	SI	SI	SI

#### 4.5 Elección de Parámetros de Validación. Fijación de los Objetivos de validación

MÉTODOS CUANTITATIVOS	
PARÁMETRO	OBJETIVO ESTABLECIDO
Matriz (Alcance)	Margarinas
Exactitud	> 80 %
Reproducibilidad	< 15%
Repetibilidad	< 10 %
Rango	25 a 250 ufc/g
Incertidumbre	< 40 %

#### 4.6 Diseño Experimental y Estadístico

<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	Verificación de la respuesta del método respecto a los objetivos de validación, probándose con muestras cuyas características son conocidas.
“Muestras” de las que se dispone para la validación	Negativos Asignados.- Muestras esterilizadas que no deben contener el analito (microorganismo target). Positivos Asignados.- Las muestras serán preparadas según se describe en el numeral 4.7
<b>Submuestras</b>	Se preparan 10 muestras por cada rango de trabajo de la validación
<b>Procesamiento</b>	Cada día se correrá un rango de trabajo de la

	validación
<b>Lectura</b>	Se obtiene una lectura por cada submuestras
<b>Función de respuesta</b>	No aplica
<b>Interpolación y cálculos</b>	No aplica
<b>Tratamiento Estadístico</b>	Análisis de la técnica de duplicado Determinación de exactitud Determinación de reproducibilidad Intervalo de trabajo validado Determinación de la incertidumbre asociada al método en cada rango de trabajo de la validación

## **4.7 Realización**

### **4.7.1 Preparación de la muestra (margarina sin flora bacteriana)**

La margarina es una emulsión líquida con consistencia plástica, generalmente del tipo agua/aceite y obtenida sobre todo a partir de grasas y aceites comestible que no proceden de la leche, con un contenido de grasa mínimo de 80%.

En un recipiente estéril se recoge aproximadamente 500 g de margarina de la parte final del proceso de producción.

Para garantizar que la muestra está libre de bacterias se realizan blanco de esta muestra por duplicado, de la siguiente manera: Se pesa 11 gramos de margarina en un diluyente que contiene una solución tampón (tampón buffer) o solución salina con 99 ml, luego se lleva al baño maría por un lapso de 15 minutos, y se agita la muestra, transcurrido este tiempo se procede a la inoculación de la muestra, para lo cual se toma una alícuota y se transfiere 1 ml de esta solución a cada placa y se vierte 20 ml de agar PCA, se lleva a incubar a 48 horas a 35°C.

Transcurrido las 48 horas de incubación se procede a la lectura de las placas obteniendo los siguientes resultados.

<b>BLANCO DE MUESTRAS DE MARGARINAS</b>	
<10	<10
<10	<10
<10	<10
<10	<10
<10	<10
<10	<10
<10	<10
<10	<10
<10	<10
<10	<10

De acuerdo a los resultados obtenidos se evidencia que la muestra se encuentra libre de flora bacteriana.

#### **4.7.2 Reactivación de Cepas y Preparación de la solución de trabajo**

En un tubo estéril se coloca 1ml de solución salina junto con un pellets de cepas en este caso S.aureus ATCC 6538P. Una vez disuelta la solución se procede a inocular en cajas de TSA mediante estrías con unas asas para las diferentes placas, se llevan a incubar cada placa por 24 horas a 35°C.

Transcurrido las 24 horas con un asa se procede a coger una colonia de las placas de TSA y se la colocas en un criobial el cual contiene una solución de glicerol y caldo.

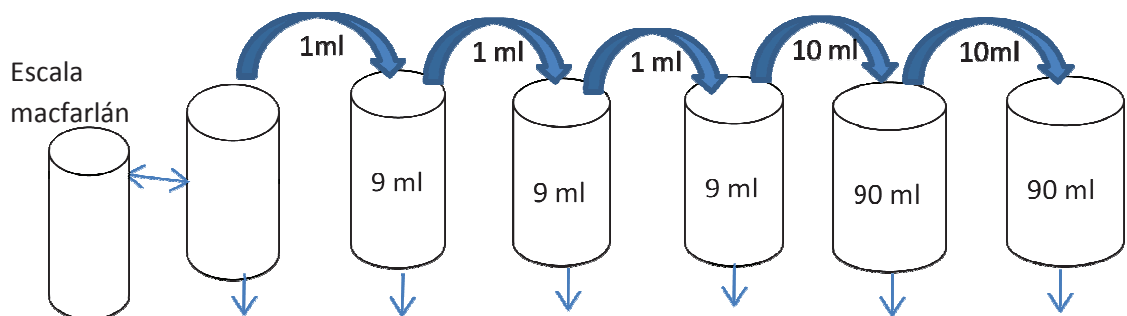
Se deja reposar unos minutos, se identifica y luego se lleva a congelar a una temperatura de -20°C.

Para utilizar las CEPAS en la validación se deben activar en una solución tampón, introduciendo 2 lentillas tomadas del criobiales de cepas en un tubo de 9ml luego se le deja incubar por 24 horas a 35°C.

Cumplido las 24 horas de incubación se verifica la turbidez del tubo con una escala McFarland el cual tiene una concentración de  $1,5 \times 10^8$  ufc/ml (suspensión bacteriana del McFarland).

A fin de obtener la solución de trabajo se procede a realizar serie de diluciones hasta obtener la concentración teórica de 1500 ufc/ml.

Se realiza una comparación entre la escala macfarlán y la concentración obtenida en el laboratorio de bacterias



1.5X10-8	1.5X10-8	1.5X10-7	1.5X10-6	1.5X10-5	1.5X10-4	SOLUCION DE TRABAJO 1.5X10-3 UFC/ML
UFC/ML	UFC/ML	UFC/ML	UFC/ML	UFC/ML	UFC/ML	

### 4.7.3 Inoculación de la solución de bacteria en la muestra

Se procede a aplicar la siguiente fórmula para obtener el volumen en ml que se inoculara en la muestra, necesario para realizar la validación:

$$C_f = \frac{C_o \times V}{M_t}$$

Donde:

**Cf:** Concentración final

**Co:** concentración inicial

**V:** volumen

**Mt:** peso de muestras

De aquí se despeja el volumen que debe ser inoculado en muestra.

$$V = \frac{C_f \times m_t}{C_o}$$

$$V = \frac{(300\text{ufc/gr})(10\text{gr})}{1500\text{ufu/ml}}$$

$$V = 2\text{ml}$$

Obtenido el volumen de concentración de la solución de trabajo (1500ufc/ml), se procede a tarar un envase estéril en la balanza y se pesa 5 gr de muestras de margarinas y se desfasa en el baño maría, adicionalmente se le agrega los 2 ml de la solución de trabajo (1500ufc/ml), y luego se completa hasta lograr los 10 gramos necesario de muestras. Se sigue el proceso de análisis normal agregando los 90 ml del diluyente (Solución Tampón). Se debe agitar bien la dilución de la muestra.

Se inocula placas petrifilm aerobios con 1ml de la dilución que contiene la muestra por duplicado (en total 20 placas petrifilm). Se lleva a incubación por 48 horas a 32°C.

Para la titulación de las bacterias se prepara agar PCA y se inocula 0,1ml de la solución de trabajo (1500ugc/ml) en cada placa más 20 ml de Agar Plate Count. Este proceso se debe realizar en un total de 10 placas, para luego llevar a incubación por 48 horas a 35°C.

Cumplido el tiempo de incubación se procede a la lectura de las placas, obteniendo los siguientes resultados:

RESULTADOS DE ANALISIS MICROBIOLÓGICOS MUESTRAS DE  
MARGARINA GIRASOL LOTE 4951

METODO DE REFERENCIA PCA		PLACAS PETRIFILM AEROBIOS		BLANCO DE MUESTRAS DE MARGARINAS	
170	172	31	29	<10	<10
168	169	38	37	<10	<10

174	176	36	37	<10	<10
167	169	38	39	<10	<10
165	168	34	33	<10	<10
173	175	32	30	<10	<10
165	166	33	32	<10	<10
179	180	32	32	<10	<10
180	182	34	33	<10	<10
159	161	32	30	<10	<10

Como se estimó una solución de trabajo teórica de 1500ufc/ml, ahora se debe establecer la concentración de ufc/ml real que existe de la solución de trabajo.

Con los datos obtenidos del conteo se empieza a extrapolar los resultados por ejemplo tenemos:

$$170 \frac{\text{ufc}}{\text{placa}} \times \frac{\text{Placa}}{0,1 \text{ ml}} = 1700 \frac{\text{Ufc}}{\text{ml}}$$

$$Cf = \frac{1700 \text{ ufc/ml} \times 2 \text{ ml}}{10 \text{ gr}} = 340 \frac{\text{Ufc}}{\text{MI}}$$

$$340 \frac{\text{ufc}}{\text{gr}} \times \frac{10 \text{ gr}}{100 \text{ ml}} = 34 \frac{\text{Ufc}}{\text{MI}}$$

$$34 \frac{\text{ufc}}{\text{ml}} \times \frac{1 \text{ ml}}{1 \text{ placa}} = 34 \frac{\text{Ufc}}{\text{Placa}}$$

En la siguiente tabla se muestra todos los datos una vez realizada la extrapolación y establecido el valor de referencia según los cálculos del método de ensayo.

Valores de referencia		Promedio
<b>34</b>	34,4	<b>34</b>
<b>33,6</b>	33,8	<b>34</b>
<b>34,8</b>	35,2	<b>35</b>
<b>33,4</b>	33,8	<b>34</b>
<b>33</b>	33,6	<b>33</b>
<b>34,6</b>	35	<b>35</b>
<b>33</b>	33,2	<b>33</b>
<b>35,8</b>	36	<b>36</b>
<b>36</b>	36,4	<b>36</b>

<b>31,8</b>	32,2	<b>32</b>
-------------	------	-----------

En la siguiente tabla se establece los valores de los resultados del ensayos con las muestra inoculadas con las bacterias.

<b>Valores medidos</b>		Promedio
<b>31</b>	29	<b>30</b>
<b>38</b>	37	<b>38</b>
<b>36</b>	37	<b>37</b>
<b>38</b>	39	<b>39</b>
<b>34</b>	33	<b>34</b>
<b>32</b>	30	<b>31</b>
<b>33</b>	32	<b>33</b>
<b>32</b>	32	<b>32</b>
<b>34</b>	33	<b>34</b>
<b>32</b>	30	<b>31</b>

**4.8 Estadístico obtenidos** **de Tratamiento los datos**

n = 10

	V. Referencia	V. Obtenido			
	X1	X2	log X1	log X 2	d= (log X1-log X2)
	34	30	1,53148	1,47712	-0,05436
	34	38	1,53148	1,57978	0,04830
	35	37	1,54407	1,56820	0,02413
	34	39	1,53148	1,59106	-0,05959
	33	34	1,51851	1,53148	0,01296
	35	31	1,54407	1,49136	-0,05271
	33	33	1,51851	1,51851	0,00000
	36	32	1,55630	1,50515	-0,05115
	36	34	1,55630	1,53148	0,02482
	32	31	1,50515	1,49136	0,01379
media ( C )	<b>34,2</b>	<b>33,9</b>	<b>1,53374</b>	<b>1,52855</b>	<b>-0,00938</b>
S	<b>1,32</b>	<b>3,14</b>	<b>0,01676</b>	<b>0,03970</b>	<b>0,04070</b>

**Exactitud**

$$t_{calc} = \frac{|\bar{d}|}{Sd/\sqrt{n}}$$

$t_{calc} = 0,394746432$

$t_{tab} = 2,26$

$t_{calc} < t_{tab}$

si

$$Rec = 10^{-\bar{d}} \cdot 100$$

**% Rec.Rel.** 98,81344992

$> 80 \pm 10\%$

si

**Precisión**

$$\%Reprod = (1 - 10^{-Sd}) \cdot 100$$

**% Reprod.** 9,119240495

$$\%RSD_{Poisson} = \frac{1}{\sqrt{C}} \cdot 100$$

**%RSD<sub>Poisson</sub>** 17,17513466

**%(Rep/RSD<sub>Poisson</sub>)**

0,530955982

**%(Rep/RSD<sub>Poisson</sub>) < 2**

si

**Incertidumbre**

$$U_{VR} = w \cdot \frac{S_{\log y}}{\sqrt{n}}$$

**U<sup>2</sup><sub>VR</sub>**

0,005299751

antlog

U<sup>2</sup>

1,012277889

1,02470653

$$U_{VM} = w \cdot \frac{S_{\log x}}{\sqrt{n}}$$

**U<sup>2</sup><sub>VM</sub>**

0,012552783

1,029325622

1,05951124

$$U_{Rep} = \frac{1}{\sqrt{C}} \cdot C$$

**U<sup>2</sup><sub>Rep</sub>**

5,822370651

33,9000

$$U_{Rec} = \frac{(1 - Rec) \cdot C}{\sqrt{3}}$$

**U<sup>2</sup><sub>Rec</sub>**

0,232233647

0,05393247

$$I = 2x \sqrt{U_{VR}^2 + U_{VM}^2 + U_{rep}^2 + U_{rec}^2}$$

**I**  
**%I**

12,00635669

35,41698138

**Experim.**  
**(C±I)**  
45,9063567  
21,8936433

**4.9 Declaración de Método Validado**

<b>PARÁMETRO</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>Resultado</b>	<b>Cumple lo Establecido</b>
Matriz (Alcance)	Margarinas	Validación en Margarina girasol	SI
Exactitud	> 80 %	98,81%	SI
Reproducibilidad	< 15%	9,11%	SI
Repetibilidad	< 10 %	<9,11%	SI
Rango	25 a 250 ufc/g	25- 250 ( CONTEO CON MEDIA DE 34)	SI
Incertidumbre	< 40 %	35,42%	SI

Al haber cumplido los objetivos de validación el método para determinación de Aerobios en margarinas queda validado.

## **CAPÍTULO 5**

### **Validación del Método de Ensayo para la Determinación de Coliformes Totales en Margarinas**

#### **5.1 Necesidad Analítica**

En el laboratorio de microbiología de La Fabril S.A surge la necesidad de validar el método de ensayo para determinación de Coliformes totales en margarinas para dar credibilidad y confianzas a los resultados emitidos a sus diferentes clientes internos que le presta servicio a la organización. Debido a que los Coliformes totales es un indicador de higiene. Las bacterias Coliformes son particularmente útiles como componentes de criterios microbiológicos para indicar contaminación postproceso térmico. El uso del recuento de Coliformes como indicador requiere un conocimiento amplio del proceso que al alimento ha sufrido (producción, procesamiento, distribución, etc.)y del efecto que él ha tenido en las bacterias Coliformes.

## **5.2 Método**

El método utilizado por el laboratorio de microbiología de la Fabril es el MA 407 Determinación de E.Coli/Coliformes. Método Oficial 991.14 AOAC. Cuenta Coliformes y Escherichia coli en Alimentos Método de película Seca Rehidratable

## **5.3 Borrador del Procedimiento.**

### **5.3.1 Definición y Alcance**

Las placas Petrifilm para el recuentos de E.COLI/COLIFORME (EC) es un medio de cultivo listo cuyo sistema contiene nutrientes, Rojo Violeta Bilis (VRB) un agente gelificante solubles en agua fría, un indicador de la actividad glucoronidasa, 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-b-D-glucuronido (BCIG) y el indicador tetrazolium que facilita la enumeración de las colonias. Las placas Petrifilm para el recuentos de EC son utilizadas para la enumeración de E.Coli/Coliformes en la industrias de alimentos y bebidas, los componentes de las placas Petrifilm para el recuentos de EC no son

esterilizados pero si son descontaminados. El departamento de microbiología 3M se encuentra certificado por las normas ISO 9001 (Organización de Estándares Internacionales).

Aplicable a muestras de margarinas de mesa e industriales.

### **5.3.2 Materiales Equipos y Reactivos.**

- ✓ Placas Petrifilm de Cuenta de E.Coli/Coliformes.
- ✓ Aplicador de plásticos Petrifilm
- ✓ Pipetas
- ✓ Contador de colonias MASCC002CO2
- ✓ Incubadora MASCC002I03
- ✓ Tampón fosfato de Butterfield (tampón fosfato IDM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 0.0425 g/l , ajustar a pH 7.2)
- ✓ Agua de peptona al 0.1%
- ✓ Buffer peptona.

### **5.3.3 PROCEDIMIENTO**

Use placas de cuenta Coliformes con película seca. Coloque la placa en una superficie plana; levante la película superior e inocule 1 ml de suspensión de prueba en el centro de la base de la película. Con cuidado desenrolle la película superior sobre el inóculo, pero distribuya sobre la placa la suspensión de prueba preparada con el difusor, con el lado plano hacia abajo. Incube las placas  $24 \pm 2$  horas a  $32 \pm 1^\circ \text{C}$ . Cuento las placas justo después del periodo de incubación. Después de que la incubación se ha completado las placas deben almacenarse (congeladas) a  $\leq 15^\circ \text{C}$  por siete días. Lo anterior debe evitarse como una práctica de rutina, pero solo cuente las colonias rojas que tengan una ó más burbujas de gas asociadas con ellas (dentro del diámetro de 1 colonia). Cuento todas las colonias en un rango contable (15-150 colonias). Las colonias rojas sin burbuja de gas no se cuentan como organismos Coliformes.

### **5.4 Identificación de las variables que intervienen en el método**

- ✓ Temperatura de incubación.
- ✓ Tiempo de incubación.
- ✓ Calibración de equipos.

- ✓ Esterilización de área.
- ✓ Esterilización de materiales.
- ✓ Esterilización de medios de cultivo.
- ✓ Fecha de caducidad de los medios de cultivo.
- ✓ Preparación de la muestra.

#### 5.4.1. Identificación de requisitos

<b>Equipos</b>	<b>U Calibración</b>	<b>k</b>	<b>Deriva</b>
Autoclave	SI	SI	SI
Balanza	SI	SI	SI
Cabina de flujo laminar	NO	NO	NO
Estufa	SI	SI	SI
Incubadora bacteriológica	SI	SI	SI
Control de temperatura de la Refrigeradora	SI	SI	SI
Contador de colonias	NO	NO	NO
Pipeta Automática	SI	SI	SI

### 5.5 Elección de Parámetros de Validación. Fijación de los Objetivos de validación

MÉTODOS CUANTITATIVOS	
PARÁMETRO	OBJETIVO ESTABLECIDO
Matriz (Alcance)	Margarinas
Exactitud	> 80 %
Reproducibilidad	< 15%
Repetibilidad	< 10 %
Rango	15 a 150 ufc/g
Incertidumbre	< 40 %

### 5.6 Diseño Experimental y Estadístico

<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	Verificación de la respuesta del método respecto a los objetivos de validación, probándose con muestras cuyas características son conocidas.
“ <b>Muestras</b> ” de las que se dispone para la validación	Negativos Asignados.- Muestras esterilizadas que no deben contener el analito (microorganismo target). Positivos Asignados.- Las muestras serán preparadas según se describe en el numeral 5.7
<b>Submuestras</b>	Se preparan 10 muestras por cada rango de trabajo de la validación

<b>Procesamiento</b>	Cada día se correrá un rango de trabajo de la validación
<b>Lectura</b>	Se obtiene una lectura por cada submuestras
<b>Función de respuesta</b>	No aplica
<b>Interpolación y cálculos</b>	No aplica
<b>Tratamiento Estadístico</b>	Análisis de la técnica de duplicado Determinación de exactitud Determinación de reproducibilidad Intervalo de trabajo validado Determinación de la incertidumbre asociada al método en cada rango de trabajo de la validación

## **5.7 Realización**

### **5.7.1 Preparación de la muestra (margarina sin flora bacteriana)**

La margarina es una emulsión líquida con consistencia plástica, generalmente del tipo agua/aceite y obtenida sobre todo a partir de grasas

y aceites comestible que no proceden de la leche, con un contenido de grasa mínimo de 80%.

En un recipiente estéril se recoge aproximadamente 500 g de margarina de la parte final del proceso de producción.

Para garantizar que la muestra está libre de bacteria se realizan blanco de esta muestra por duplicado, de la siguiente manera: Se pesa 11 gramos de margarina en un diluyente que contiene una solución tampón o solución salina con 99 ml, luego se lleva al baño maría por un lapso de 15 minutos, y se agita la muestra, transcurrido este tiempo se procede a la inoculación de la muestra, para lo cual se toma una alícuota y se transfiere 1 ml de esta solución a cada placa y se vierte 20 ml de agar PCA, se lleva a incubar a 48 horas a 35°C.

Transcurrido las 48 horas de incubación se procede a la lectura de las placas obteniendo los siguientes resultados.

<b>BLANCO DE MUESTRAS DE MARGARINAS</b>	
<10	<10
<10	<10
<10	<10
<10	<10
<10	<10
<10	<10
<10	<10
<10	<10
<10	<10
<10	<10
<10	<10

De acuerdo a los resultados obtenidos se evidencia que la muestra se encuentra libre de flora bacteriana.

### **5.7.2 Reactivación de Cepas y Preparación de la solución de trabajo**

En un tubo estéril se coloca 1ml de solución salina junto con un pellets de cepas en este caso E.coli ATCC 8739. Una vez disuelta la solución se procede a inocular en cajas de TSA mediante estrías con unas asas para las diferentes placas, se llevan a incubar cada placa por 24 horas a 35°C.

Transcurrido las 24 horas con un asa se procede a coger una colonia de las placas de TSA y se la colocas en un criobial el cual contiene una solución de glicerol y caldo.

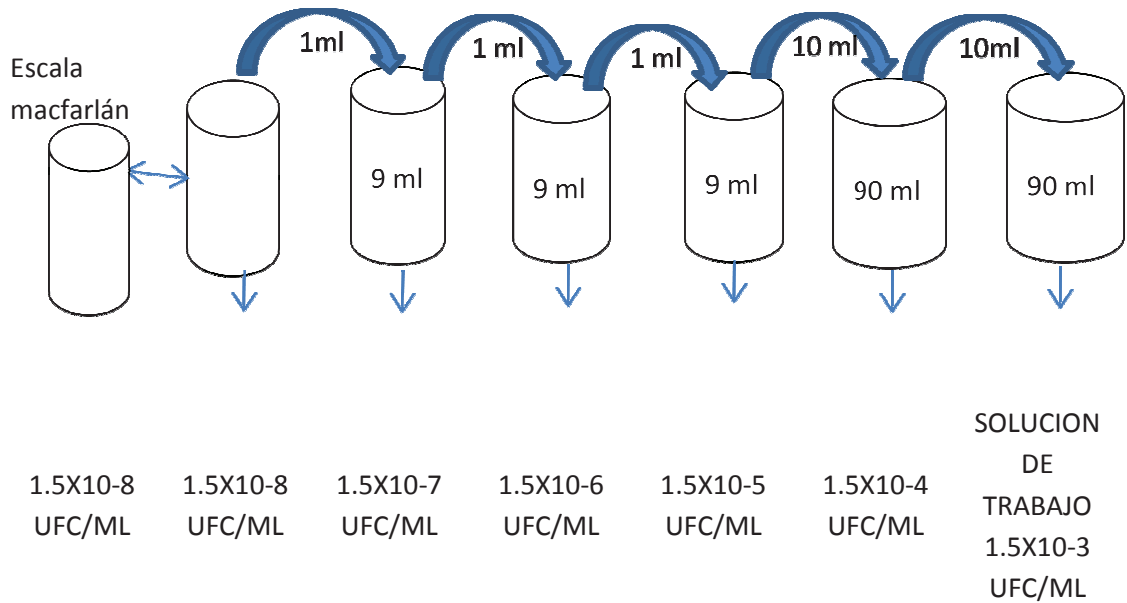
Se deja reposar unos minutos, se identifica y luego se lleva a congelar a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Para utilizar las CEPAS en la validación se deben activar en una solución tampón, introduciendo 2 lentillas tomadas del criobiales de cepas en un tubo de 9ml luego se le deja incubar por 24 horas a  $35^{\circ}\text{C}$ .

Cumplido las 24 horas de incubación se verifica la turbidez del tubo con una escala MCFarland el cual tiene una concentración de  $1,5 \times 10^8$  ufc/ml.

A fin de obtener la solución de trabajo se procede a realizar serie de diluciones hasta obtener la concentración teórica de 1500 ufc/ml (suspensión bacteriana del Mcfarland).

Se realiza una comparación entre la escala macfarlán y la concentración obtenida en el laboratorio de bacterias



### 5.7.3 Inoculación de la solución de bacteria en la muestra

Se procede a aplicar la siguiente fórmula para obtener el volumen en ml que se inoculara en la muestra, necesario para realizar la validación:

$$Cf = \frac{Co \times V}{Mt}$$

Donde:

**Cf:** Concentración final

**Co:** concentración inicial

**V:** volumen

**Mt:** peso de muestras

De aquí se despeja el volumen que debe ser inoculado en muestra.

$$V = \frac{Cf \times mt}{Co}$$

$$V = \frac{(300ufc/gr)(10gr)}{1500ufu/ml}$$

$$V = 2ml$$

Obtenido el volumen de concentración de la solución de trabajo (1500ufc/ml), se procede a tarar un envase estéril en la balanza y se pesa 5 gr de muestras de margarinas y se desfasa en el baño maría, adicionalmente se le agrega los 2 ml de la solución de trabajo

(1500ufc/ml), y luego se completa hasta lograr los 10 gramos necesario de muestras. Se sigue el proceso de análisis normal agregando los 90 ml del diluyente (Solución Tampón). Se debe agitar bien la dilución de la muestra.

Se inocula placas petrifilm Coliformes con 1ml de la dilución que contiene la muestra por duplicado (en total 20 placas petrifilm). Se lleva a incubación por 24 horas a 32°C.

Para la titulación de las bacterias se prepara agar PCA y se inocula 0,1ml de la solución de trabajo (1500ugc/ml) en cada placa más 20 ml de Agar Plate Count. Este proceso se debe realizar en un total de 10 placas, para luego llevar a incubación por 48 horas a 35°C.

Cumplido el tiempo de incubación se procede a la lectura de las placas, obteniendo los siguientes resultados.

<b>RESULTADOS DE ANALISIS MICROBIOLÓGICOS MUESTRAS DE MARGARINA GIRASOL LOTE 5221</b>					
<b>METODO DE REFERENCIA PCA</b>		<b>PLACAS PETRIFILM COLIFORMES</b>		<b>BLANCO DE MUESTRAS DE MARGARINAS</b>	
<b>219</b>	221	42	44	<10	<10
<b>213</b>	219	46	45	<10	<10
<b>224</b>	226	41	43	<10	<10
<b>217</b>	219	45	47	<10	<10
<b>225</b>	228	42	43	<10	<10
<b>223</b>	229	41	43	<10	<10
<b>225</b>	226	45	46	<10	<10
<b>219</b>	215	41	42	<10	<10
<b>209</b>	211	43	45	<10	<10
<b>219</b>	219	44	45	<10	<10

Como se estimo una solución de trabajo teórica de 1500ufc/ml, ahora se debe establecer la concentración de ufc/ml real que existe de la solución de trabajo.

Con los datos obtenidos del conteo se empieza a extrapolar los resultados por ejemplo tenemos:

$$219 \frac{\text{ufc}}{\text{placa}} \times \frac{\text{Placa}}{0,1 \text{ ml}} = 2190 \frac{\text{ufc}}{\text{ml}}$$

$$Cf = \frac{2190 \text{ ufc/ml} \times 2 \text{ ml}}{10 \text{ gr}} = 438 \frac{\text{ufc}}{\text{ml}}$$

$$438 \frac{\text{ufc}}{\text{gr}} \times \frac{10 \text{ gr}}{100 \text{ ml}} = 43,8 \frac{\text{ufc}}{\text{ml}}$$

$$43,8 \frac{\text{ufc}}{\text{ml}} \times \frac{1 \text{ ml}}{1 \text{ placa}} = 43,8 \frac{\text{ufc}}{\text{placa}}$$

En la siguiente tabla se muestra todos los datos una vez realizada la extrapolación y establecido el valor de referencia según los cálculos del método de ensayo.

Valores de referencia		Promedio
43,8	44,2	44
42,6	43,8	43
44,8	45,2	45
43,4	43,8	44
45	45,6	45
44,6	45,8	45
45	45,2	45
43,8	43	43
41,8	42,2	42
43,8	43,8	44

En la siguiente tabla se establece los valores de los resultados del ensayos con las muestra inoculadas con las bacterias.

Valores medidos		Promedio
42	44	43
46	45	46
41	43	42
45	47	46
42	43	43
41	43	42
45	46	46
41	42	42
43	45	44
44	45	45

### 5.8 Tratamiento Estadístico de los datos obtenidos

n = 10	V. Referencia	V. Obtenido			
	X1	X2	log X1	log X 2	d= (log X1-log X2)
	44	43	1,64345	1,63347	-0,00998
	43	46	1,63548	1,65801	0,02253
	45	42	1,65321	1,62325	-0,02996
	44	46	1,63949	1,66276	-0,02327
	45	43	1,65610	1,62839	-0,02771
	45	42	1,65514	1,62325	-0,03189
	45	46	1,65418	1,65801	-0,00383
	43	42	1,63749	1,61805	-0,01944
	42	44	1,62325	1,64345	-0,02020
	44	45	1,64147	1,64836	-0,00689
media ( C )	<b>44,06</b>	<b>43,65</b>	<b>1,64393</b>	<b>1,63970</b>	<b>-0,01507</b>
S	<b>1,08</b>	<b>1,67</b>	<b>0,01070</b>	<b>0,01656</b>	<b>0,01636</b>

**Exactitud**

$$t_{calc} = \frac{|\bar{d}|}{Sd/\sqrt{n}}$$

$t_{calc} = 0,597648606$

$t_{tab} = 2,26$

$t_{calc} < t_{tab}$

si

$$Rec = 10^{-\bar{d}} \cdot 100$$

% Rec.Rel. 99,03154715

> 80±10%

si

**Precisión**

$$\%Reprod = (1 - 10^{-Sd}) \cdot 100$$

% Reprod. 5,018923723

$$\%RSD_{Poisson} = \frac{1}{\sqrt{C}} \cdot 100$$

%RSD<sub>Poisson</sub> 15,13588697

%(Rep/RSD<sub>Poisson</sub>) 0,331590989

%(Rep/RSD<sub>Poisson</sub>) < 2

si

**Lim. Determinación**

$$LD = \frac{1}{RSD^2}$$

396,989307

**Incertidumbre**

$$U_{VR} = w \cdot \frac{S_{\log y}}{\sqrt{n}}$$

$U^2_{VR}$

0,003385201

antlog

$U^2$

1,007825171

1,01571158

$$U_{VM} = w \cdot \frac{S_{\log x}}{\sqrt{n}}$$

$U^2_{VM}$

0,00523682

1,012131217

1,0244096

$$U_{Rep} = \frac{1}{\sqrt{C}} \cdot \frac{C}{\sqrt{n_d}}$$

$U^2_{Rep}$

6,606814664

43,6500

$$U_{Rec} = \frac{(1 - Rec) \cdot C}{\sqrt{3}}$$

$U^2_{Rec}$

0,244063087

0,05956679

$$I = 2x \sqrt{U_{VR}^2 + U_{VM}^2 + U_{rep}^2 + U_{rec}^2}$$

I  
%I

13,52770313

30,99130155

Experim.  
(C±I)  
57,1777031  
30,1222969

### 5.9 Declaración de Método Validado

<b>PARÁMETRO</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>Resultado</b>	<b>Cumple lo Establecido</b>
Matriz (Alcance)	Margarinas	Validación en Margarina girasol	SI
Exactitud	> 80 %	99,03%	SI
Reproducibilidad	< 25%	5,01%	SI
Repetibilidad	< 20 %	<5,01%	SI
Rango	15 a 150 ufc/g	15- 150 ( CONTEO CON MEDIA DE 44)	SI
Incertidumbre	< 40 %	30,99%	SI

Al haber cumplido los objetivos de validación el método para determinación de Coliformes en margarinas queda validado.

## **CAPÍTULO 6**

### **Conclusiones y Recomendaciones**

#### **6.1 CONCLUSIONES:**

Se comprueba que los métodos son confiables y los resultados obtenidos están dentro de las condiciones.

Se comprueba la especificidad del método al haber utilizado el inóculo de cepas ATCC 8739 E.COLI y el inóculo de S. áureos ATCC 6538P

Se comprueba la repetibilidad del método con el grado de concordancia entre los resultados obtenidos.

Los cultivos de referencia ATCC utilizado nos sirvieron para evaluar la calidad de los medios de cultivos y el aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayos.

Refleja las condiciones reales de ensayos usando en este caso matriz de productos grasos (margarinas)

EL análisis de diversos factores que influyen en las técnicas como son medios de cultivos, equipos, ambientes, entre otras dieron confiabilidad a la validación realizada.

Se encontró evidencia estadísticamediante el análisis de datos hallados en las respectivas pruebas, demostrando que tanto la técnicas de recuentos en placas petrifilm de aerobios y Coliformes totales son repetibles y reproducibles.

## **6.2 RECOMENDACIONES:**

Se recomienda utilizar la validación de métodos para establecer tablas de control y con ello asegurar la calidad de los resultados de ensayos.

Se sugiere inculcar en los diferentes laboratorios el interés de la implementación de procedimientos que permitan la mejora continua en los métodos utilizados.

Mediante el desarrollo de la validación dar confiabilidad a otras técnicas utilizadas a diarios en el laboratorio de LA FABRIL S.A. como son recuentos en placas deEstafilococo áureus, mohos y levaduras, filtración de membrana para Coliformes totales y fecales, entre otros.

# *BIBLIOGRAFÍA*

- ISO/IEC 17025, Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración
- Guía ISO 30, Términos y definiciones utilizados en relación con los materiales de referencia.
- ISO 13843, Calidad del agua – Guía para la validación de métodos microbiológicos
- Organismo de Acreditación Ecuatoriana OAE
- AOAC INTERNATIONAL, Qualitative and quantitative Guidelines for Methods Validation. Journal of AOAC International Vol. 82, No. 2, 1999
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE-INEN 276:2005
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE-INEN 2 184
- HAYES P.R.1993. Microbiología e higiene de los alimentos. Editorial Acribia S: A. Zaragoza España.
- ISO 9000, 2000. Sistema de gestión de calidad.

- 3M y Petrifilm son marcas registradas de 3M FP 109901297  
MicrobiologyProducts  
  
Laboratoires 3M Santé
- Organismo de Acreditación Ecuatoriano - OAE CR GA10 R01  
Criterios Generales para la participación en Ensayos de Aptitud.
- OGA-GEC-016 *“Política de Selección y Validación de Métodos de Ensayo”*.
- Criterios generales para la acreditación de laboratorio de ensayo y calibración según norma UNE-ENAC-LEC Rev. 5 Octubre 2009
- G-ENAC-04 Rev.3 Noviembre 2002 “GUIA PARA LA ACREDITACIÓN DE LABORATORIOS QUE REALIZAN ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS”.

# ANEXOS



**Punto de llenado de margarina girasol maquina gerluis**



**Maquina Gerluis empacando margarinas qirasol presentación 500 g**



**Reactivación de cepas**



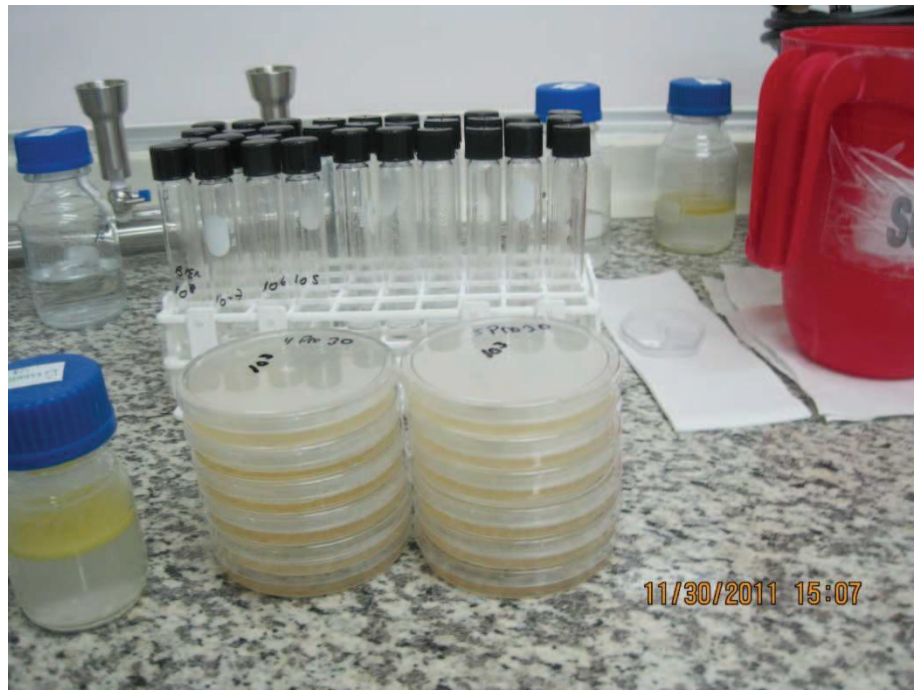
**Reactivación de cepas**



**Reactivación de cepas**



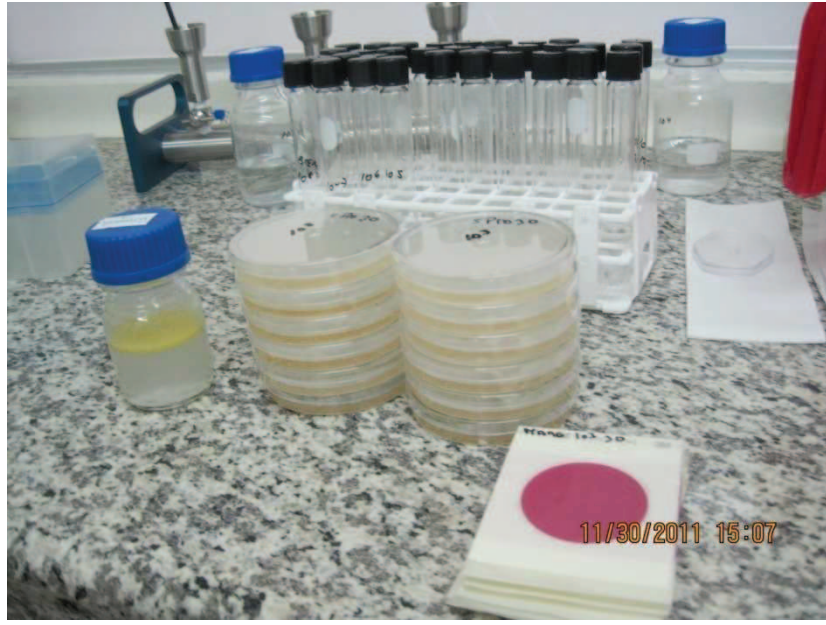
**Se inocular 1 ml de muestra en cada placa petrifilm se realiza la siembra**



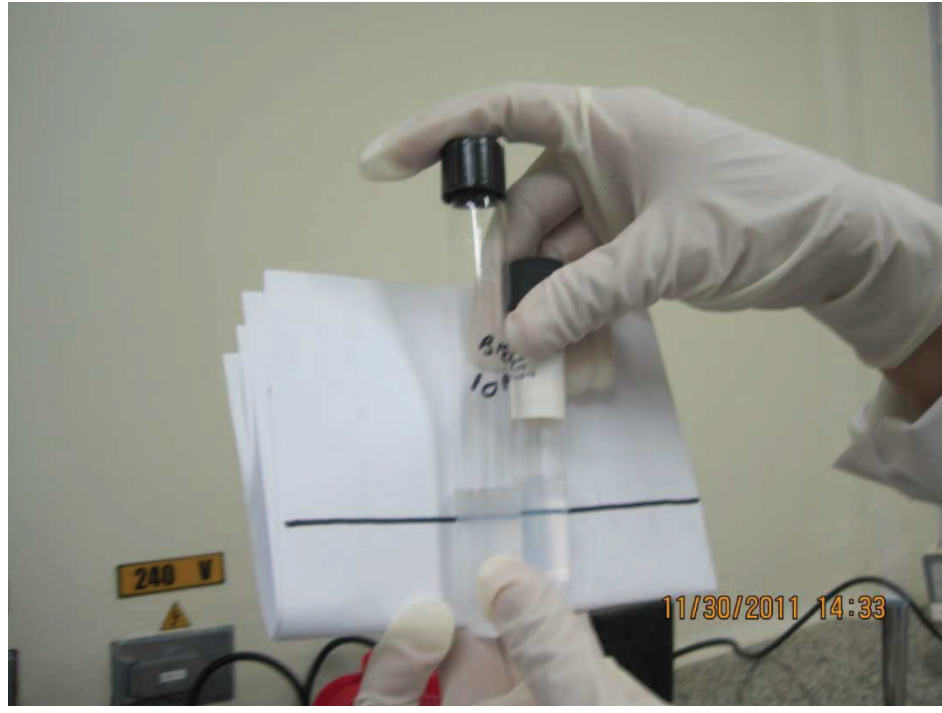
**Placas petri listas para incubación**



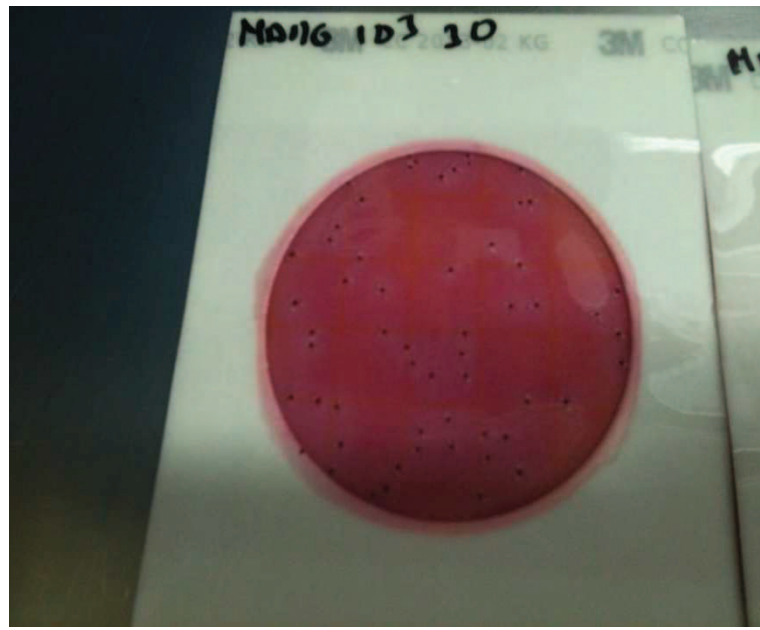
**Transferencia de lentillas de cepas a tubo con solución tampón**



**Placas inoculadas**



**Comparación de solución obtenida de bacteria con la escala MCFarland**



**Crecimiento de Coliformes totales en placas petrifilm**



**Crecimiento de Colonias en Agar Plate Count (PCA)**