

CALIDAD ANALÍTICA

El principal objetivo de un laboratorio es producir datos analíticos de precisión y confiabilidad suficientes en un plazo aceptable y a un costo admisible. La garantía de calidad es el proceso total que asegura la confiabilidad de los resultados de laboratorio.

Un programa de garantía de calidad proporciona un registro de seguimiento que asegura la integridad de la muestra, con documentación para verificar que los instrumentos de laboratorio funcionan adecuadamente y que los datos del laboratorio se produjeron según procedimientos normalizados. Esta garantía abarca tanto el control como la evaluación de la calidad (1).

Un programa de garantía de la calidad contiene tres elementos esenciales:

- *Prevención.* Comprende una planificación ordenada y una serie de medidas positivas antes y durante los análisis, para asegurar que todos los sistemas analíticos funcionan adecuadamente, por ejemplo la utilización de medios de cultivo estandarizados, la calibración y el mantenimiento de los instrumentos, la formación continua de los analistas.
- *Evaluación.* Consiste en comprobaciones periódicas del rendimiento mediante el análisis de muestras seleccionadas, usando una metodología validada.
- *Corrección.* Abarca las medidas adoptadas para determinar las causas de los defectos de calidad y restablecer el funcionamiento adecuado de las operaciones analíticas, por ejemplo la reparación de los equipos averiados, la revisión de la metodología, la capacitación del personal (2).

La *acreditación* es un componente de la garantía de calidad y consiste en la auditoría por un agente externo para procurar que el laboratorio se ajuste a ciertos cánones definidos. Un esquema de acreditación debe ser completo, cubriendo todos los aspectos del laboratorio, incluidos organización y administración, formación y actualización del personal, equipamiento y comodidades, procedimientos y criterios (1).

LABORATORIO

Aunque el diseño lo hacen los arquitectos o ingenieros, los analistas deben participar en las decisiones que afectarán, finalmente, a su medio de trabajo y las condiciones en que éste se desarrollará.

El laboratorio de microbiología no debe ocupar una sola sala polivalente, sino más bien dos o más locales dedicados al almacenamiento del instrumental de vidrio y de los medios deshidratados, la preparación y esterilización de los medios, la descontaminación del material peligroso, la zona de trabajo analítico y el almacenamiento de las muestras a analizar y las ya analizadas que pasan a la reserva.

Si los medios, reactivos y los materiales de vidrio se deben almacenar en la misma habitación en que se llevan a cabo los análisis microbiológicos, se guardan en envases herméticos dentro de armarios limpios de polvo, preferentemente con puertas corredizas que permanecen cerradas cuando no es necesario acceder a los mismos. En las paredes pueden colocarse, con el mismo fin, estanterías protegidas por puertas corredizas.

Es conveniente utilizar dos autoclaves ubicados a bastante distancia uno de otro, para la esterilización de los medios y la descontaminación del material peligroso, a fin de reducir al mínimo las posibilidades de contaminación mutua. El material de vidrio puede lavarse en el mismo local donde se encuentran los autoclaves.

Debe preverse en cada local dos puertas, para facilitar una rápida evacuación en caso de incendio o cualquier otra emergencia. También es conveniente una habitación propia para el personal, por pequeña que sea.

Los muros deben pintarse con una pintura impermeable y a prueba de moho, que proporcione una superficie lisa de fácil limpieza. Los suelos deben ser de baldosas resistentes, lisas y que puedan fregarse rápidamente (2).

El laboratorio de microbiología debe estar alejado de cualquier lugar en que haya emanaciones de gases o humos. Conviene que esté equipado con aire acondicionado filtrado, porque los ventiladores levantan polvo y pueden ser una causa importante de contaminación. Las ventanas cerradas reducen al mínimo las corrientes de aire que pueden causar

contaminación e impiden la entrada de insectos voladores. Si la temperatura del local supera los 23°C, las estufas de cultivo no funcionan bien así como los medidores de pH (3).

Suele ser conveniente la instalación de una campana de ventilación con su propio suministro de gas, agua y electricidad, y la compuerta deberá bajarse hasta el nivel indicado por el fabricante. La eficiencia del sistema de ventilación se debe verificar todos los años. La campana no debe emplearse para el almacenamiento de materiales.

La zona de trabajo debe mantenerse despejada para los análisis microbiológicos y no se ha de emplear para almacenar equipo de laboratorio, soportes u otros instrumentos. Debe estar hecha de material no poroso, impermeable y exento de intersticios, empalmes visibles u otras zonas defectuosas en las que puedan crecer los microorganismos, y contar con gas, agua, aire y electricidad. Es conveniente instalar con una campana de flujo laminar (1).

Debe haber otras mesadas auxiliares. Algunas piezas del equipo de laboratorio, como por ejemplo el baño agua o la centrífuga, no deben estar en la misma mesada en que se colocan los microscopios o las balanzas (2).

Las muestras se reciben, almacenan, manejan y analizan en condiciones ambientales que no afecten desfavorablemente a los análisis. La temperatura, la humedad y la iluminación deben ser adecuados para proteger las muestras, los extractos, el personal y el equipo. Se debe llevar un registro de los resultados del muestreo ambiental en los locales del laboratorio.

El control microbiológico de las superficies del laboratorio permite determinar la limpieza de la zona de trabajo y la frecuencia necesaria de dicha operación. La vigilancia microbiológica del aire sirve para verificar la eficacia de los filtros de aire y la frecuencia con que deben cambiarse, así como cualquier fuente posible de contaminación ambiental de las muestras (3).

El recuento de los microorganismos en las superficies del laboratorio puede efectuarse por el método de frotación o el de contacto directo del microorganismo con una placa rebosante de agar para recuento. Si la superficie fue limpiada con compuestos fenólicos o de amonio cuaternario, se agrega 0,5%

de polisorbato 80 y 0,7% de lecitina de soja al medio (1). La calidad microbiológica del aire ha de verificarse por lo menos semanalmente, mediante la sedimentación del polvo residual sobre la placa de medio de cultivo (2).

Las bacterias y esporas fúngicas pueden estar suspendidas en el aire aisladamente, en grumos o adheridas a la superficie del polvo proveniente de los materiales procesados. Las partículas más pequeñas pueden quedar suspendidas en el aire por largos periodos, moviéndose con las corrientes de aire, y los filtros de los acondicionadores de aire suelen no removerlas. Las partículas más grandes se asientan rápidamente y contaminan las superficies (1).

VIGILANCIA DE SUPERFICIES

Cortar esponjas de celulosa en piezas de 1 x 5 x 5 cm, ponerlas en bolsas individuales de papel y esterilizarlas en autoclave.

Humedecer una pieza con 10 mL de diluyente y frotar vigorosamente 1 m² de la zona seleccionada, sujetándola con una pinza o un guante esterilizado. Colocarla en una bolsa plástica esterilizada, agregar 100 mL de diluyente, aplicar un masaje vigoroso a la esponja durante 1 minuto y dejar 20-30 minutos.

Transferir dos alícuotas de 1 mL a sendas cajas de Petri y volcar 15 mL de agar para recuento fundido y enfriado a 45-50°C. Incubar las placas a 30 y 35°C durante 48 hs.

Calcular el número de microorganismos en el área frotada (2).

CONTROL DEL AIRE

Exponer dos placas de agar para recuento al ambiente del laboratorio durante 15 minutos. Colocar las tapas e incubar a 30°C. Contar el número de colonias. Más de 15 colonias por placa indica que la calidad del aire es inapropiada (2).

AGAR PARA RECuento. Triptona 5 g, extracto de levadura 2,5 g, glucosa 1 g, agar 15 g, agua 1 litro, pH 7. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos (1).

Los suelos, mesadas y otras superficies deben limpiarse con regularidad. Todas las superficies deben frotarse con un trapo húmedo. El aerosol generado por barrido demora unas tres horas en sedimentar. También hay que limpiar las

campanas, el equipo y el instrumental de vidrio. Los congeladores y refrigeradores deben vaciarse y limpiarse periódicamente, sin poner en peligro la integridad del contenido.

Hay que prever la eliminación de insectos atraídos por los alimentos almacenados, inevitable cuando se trata de muestras en litigio. Debe llevarse un registro de las operaciones de limpieza, desinfección y desinsectación (2).

PERSONAL

En un laboratorio típico hay dos clases de personal: analistas y auxiliares, estos últimos preparan medios y soluciones, y limpian el material. Los auxiliares deben ser conscientes de la importancia de su cometido y de la necesidad de informar cualquier circunstancia que exceda a sus posibilidades o conocimientos, ya que la capacitación y supervisión de los mismos depende de los analistas (2).

La formación continua de los analistas se determina en función de los objetivos definidos para el laboratorio y es un medio que permite producir resultados de calidad aceptable. Deberán organizarse actividades de capacitación en la metodología analítica específica, a veces en el mismo laboratorio, bajo la responsabilidad del director.

Un programa de verificación de muestras es un ensayo efectuado entre diversos laboratorios para determinar la eficiencia analítica de los participantes. Un laboratorio de referencia prepara las muestras homogéneas con niveles teóricamente iguales de microorganismos. Los resultados cuali o cuantitativos se envían al laboratorio de procedencia para su evaluación estadística. La presencia de resultados discrepantes, como los positivos falsos o negativos falsos, es causa de preocupación.

Otro tipo de programa de ensayos entre laboratorios es el estudio en colaboración, con el que se miden los resultados de un método. Trabajando independientemente, los participantes analizan las muestras de ensayo con el método que debe validarse y envían los resultados al laboratorio de procedencia. Los datos se analizan estadísticamente y los resultados del método se expresan en términos de exactitud, capacidad de reproducción y repetición (3).

MUESTRAS

La información y el estado de las muestras que van a ser analizadas influye de modo muy importante en su validez y por tanto en la calidad de los resultados obtenidos. Por consiguiente, la toma de muestras debe realizarse con tanto cuidado como el propio análisis. La operación de muestreo debe ser organizada de antemano con todos los instrumentos y envases estériles a mano (3).

Siempre que sea posible, se eligen cinco o diez unidades del mismo producto según el plan de muestreo. Se mezclan y toman muestras de cada una de estas unidades con cucharas o cuchillos estériles. Todas las fases (acuosa, grasa, granular, etc.) deben estar representadas. Se registra la temperatura, el estado y las características especiales de las muestras. Las muestras de un lote de alimento preparado a escala industrial se eligen aleatoriamente y se obtienen al menos diez, siempre que sea posible (4).

Cuando el muestreo no es realizado por el analista, es esencial disponer de un registro escrito que responda de la integridad de la muestra entre el momento de recolección y la utilización definitiva.

En cada ficha debe constar el número de subunidades de la muestra, el nombre del producto, el nombre del recolector, la fecha y hora de muestreo y recepción en el laboratorio, el método y lugar de almacenamiento, el nombre del analista, la fecha de análisis, el método y lugar de almacenamiento de reserva en los casos de muestras oficiales, el método y fecha de eliminación o destino final de la muestra (2).

Las muestras percederas deben transportarse al laboratorio refrigeradas y entre el momento de la llegada al mismo y el inicio del análisis deben mantenerse a una temperatura de 0 a 4°C. Los alimentos congelados se mantienen en ese estado. El análisis debe realizarse entre las 6 y 24 hs de la toma de la muestra, según el tipo de alimento.

Se emplea hielo seco o “hielo-gel” comercial/hielo normal para mantener las muestras congeladas o refrigeradas, respectivamente, durante el transporte al laboratorio, evitando el contacto del producto con el hielo fundido. La integridad de la muestra entre el momento de recolección y el de la entrega

al laboratorio se garantiza mediante un precinto, y quien la recibe verifica el estado del mismo (3).

Para efectuar el estudio, el analista extrae una porción de cada unidad de muestra y las examina separadamente. Si el alimento está molido, triturado o en polvo, o es líquido o semilíquido, se mezcla con un utensilio esterilizado antes de extraer la porción de ensayo. La unidad congelada debe descongelarse rápidamente en un baño de agua con una agitación continua, termostáticamente controlado, sin sacar el producto del envase (2).

Las muestras que contienen microorganismos peligrosos deben ser tratadas en autoclave y las que contienen toxinas fúngicas sumergidas en solución comercial de hipoclorito de sodio diluido 1/10, antes de ser eliminadas.

EQUIPAMIENTO

Cámaras de cultivo

Se coloca un rótulo en el exterior, indicando la temperatura a la que deben mantenerse. Algunos modelos suelen ser muy sensibles a las variaciones diarias de la temperatura ambiente y se deben adoptar las precauciones necesarias, especialmente en verano.

La temperatura interior se debe observar con uno o más termómetros, según el tamaño de la estufa. Las cámaras grandes sufren menos fluctuaciones de temperatura que las pequeñas (1). El margen de tolerancia es de ± 1 a 2°C . El termómetro de inmersión parcial, con un intervalo de graduación de $0,1^{\circ}\text{C}$, debe estar inserto en un tubo con agua cuya boca estará sellada con masilla para evitar la evaporación. Todos los termómetros deben calibrarse una vez al año.

Para cultivos a $15\text{-}20^{\circ}\text{C}$ se requiere más bien un refrigerador antes que una estufa, pero algunas cámaras tienen ambas cualidades con controles de calentamiento y enfriamiento (2).

Los recipientes con los cultivos deben estar claramente etiquetados con el nombre del analista y la fecha y hora en que se introdujo. Los cultivos que deben incubarse durante 3 a 7 días se colocan dentro de bolsas plásticas junto a un vaso con agua para mantener la humedad.

Todo derrame que se produzca dentro de una cámara se debe absorber y desinfectar de inmediato. Por lo menos una vez al mes se debe limpiar en interior de las cámaras.

Baño de agua

Se emplea toda vez que se deba mantener la temperatura dentro de un margen de tolerancia de $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Se carga con agua destilada para evitar depósitos calcáreos, excepto los que están conectados al grifo de agua corriente porque tienen un dispositivo que mantiene el nivel constante. La tapa tiene que estar bien ajustada para impedir una excesiva evaporación (1).

Si no se utilizará en dos semanas, se drena el agua, se lava y seca el interior. Se debe inspeccionar con frecuencia para impedir o retrasar los daños causados por la corrosión.

La temperatura se suele controlar después de un período de estabilización de 3 horas, con un termómetro de inmersión total cuyo intervalo de graduación es de $0,1^{\circ}\text{C}$. Generalmente se utiliza a $44,5 - 45,5^{\circ}\text{C}$, rango en el cual un cultivo de *Escherichia coli* incubado durante 24 hs produce gas y el de *Enterobacter aerogenes* no lo forma en el medio EC (triptona 20 g, lactosa 5 g, sales biliares 1,5 g, fosfato dipotásico 4 g, fosfato monopotásico 1,5 g, cloruro de sodio 5 g) (2)

Refrigerador y congeladora

El refrigerador se debe mantener a una temperatura de menor a 5°C . El exterior se limpia por lo menos una vez al mes y el interior del equipo desconectado cada tres meses. Se vigila con termómetros de inmersión para baja temperatura cuyo intervalo de graduación es de 1°C .

La congeladora se mantiene a una temperatura de -20°C y se debe desconectar y limpiar cada seis meses. Todos los recipientes tienen que llevar rótulos con el tipo de material, el nombre del responsable y la fecha de depósito.

Todo funcionamiento defectuoso de los aparatos del laboratorio y las reparaciones realizadas deben ser documentadas (2).

Autoclave

Es preferible el modelo de carga horizontal. Conviene que posea un termómetro calibrado para medir una temperatura

interna de 120°C (2), el uso de un manómetro de presión no es útil a alturas superiores a los 900 m snm porque ya no coincidirá la temperatura interna con la escala dada por los fabricantes a nivel del mar (5).

El interior de la cámara de esterilización se debe limpiar todos los días. Semanalmente se lava el desagüe de la cámara y el generador de vapor, y se verifican las señales de control y el estado del aparato. Todos los meses se lubrica la bisagra de la puerta de la cámara y trimestralmente se inspeccionan las juntas de la puerta y la válvula de purga. Se debe utilizar agua con baja dureza (2).

En caso de que se disponga del clásico autoclave de Chamberland (tipo olla a presión) hay que considerar que el vapor saturado a una presión absoluta de 2,02 kg/cm² tiene una temperatura de 120°C, y la presión absoluta es la suma de la presión atmosférica del lugar más la presión indicada por el manómetro. Cuanto mayor sea la altura sobre el nivel del mar, más baja es a presión ambiente y mayor la presión que debe indicar el manómetro para alcanzar la temperatura de esterilización, por ejemplo la lectura manométrica en San Salvador de Jujuy y en Salta debe ser de 1,2 kg/cm², y de 1,4 kg/cm² en Abra Pampa (5).

Se debe registrar en cada ciclo de esterilización, la temperatura y el tiempo, los materiales, la presión máxima alcanzada, la fecha y la hora de comienzo y finalización (3).

La eficacia se controla mediante el método indirecto de colocar una ampolla con esporos de *Geobacillus stearothermophilus*, los que deben estar muertos luego de cumplir el ciclo de esterilización.

Todas las semanas se vacía la caldera y trimestralmente se inspeccionan la válvula de purga, la junta de la tapa y las arandelas de los tornillos de cierre, reemplazándolas cuando fuere necesario (1).

Estufa u horno de esterilización

Se emplea para la mayoría del material de vidrio. Se registra el material tratado, el tiempo y la temperatura en cada ciclo de esterilización. Periódicamente se hace un control de esterilidad del material de vidrio tratado (3).

El horno debe tener un termómetro calibrado que registre temperaturas entre 160 y 180°C. Se deben vigilar diversos puntos internos con termómetros para altas temperaturas cuyo intervalo de graduación no supere 1°C. Todos los meses se deben limpiar las superficies internas y externas (2).

Balanza

El laboratorio debe estar equipado con una balanza de 200-300 g de capacidad y una sensibilidad de 0,1 g, y otra con una capacidad de 100-150 g y una sensibilidad de 1 mg. Cada vez que se usan se debe limpiar los platillos de pesada. La exactitud de las balanzas debe verificarse cada tres meses con pesas calibradas. Conviene que anualmente un representante del fabricante haga una limpieza y calibración de la balanza analítica de alta precisión (2).

pHmetro

Es preferible usar un medidor de pH antes que las tiras indicadoras para los medios rehidratados, las soluciones y otros materiales, pero para productos con pH <4,0 es aceptable el empleo de los papeles indicadores (3).

Si el aparato es nuevo se deben seguir las instrucciones del fabricante para su puesta en marcha. Los electrodos necesitan cuidados especiales. Cuando se transfieren de una solución a otra, se deben enjuagar con la segunda solución y con agua desmineralizada al terminar el trabajo. El procedimiento de almacenamiento depende del tipo de electrodo, los de vidrio deben colocarse en una solución reguladora neutra, para los de referencia se usa una solución de cloruro de potasio 0,1 M.

Los pHmetros se controlan antes de cada uso con soluciones reguladoras de pH 4,0, 7,0 y 10,0. Hay que dejar que las muestras y soluciones alcancen la misma temperatura antes de efectuar las mediciones.

Con el uso o el tiempo la eficiencia de un electrodo se reduce. Deberá limpiarse la punta con ácido clorhídrico 0,1 M, luego con solución de EDTA, terminando con acetona o metanol. Si las lecturas erráticas persisten se debe a otras causas y probablemente haya que sustituirlo (2).

Campana de flujo laminar

De preferencia el flujo debe ser vertical, provisto de un filtro HEPA que elimine partículas $< 0,3 \mu\text{m}$ de diámetro. Deben ponerse en marcha sólo cuando vaya a ser utilizada. No se recomienda el empleo de mecheros dentro de la campana pues provocan una columna ascendente de aire más intensa que el flujo descendente de aire filtrado (2).

En una cámara de flujo laminar (o de seguridad tipo II) elrededor del 70% del aire es reciclado a través de los filtros de manera que el área de trabajo es bañada por aire casi estéril. Pero algo del aire (alrededor del 30%) sale a la atmósfera y es reemplazado por una cortina de aire ambiental que entra por la cara frontal del equipo. Esto previene el escape de cualquier partícula o aerosol generado durante el trabajo fuera de la cámara (4).

EFICACIA DE LÁMPARA UV GERMICIDA

Preparar con el diluyente, una suspensión de un cultivo de *E. aerogenes* de 24 hs en agar nutritivo, que tenga una densidad óptica igual a la del tubo 1 de Mac Farland.

Llevar 1 mL de la suspensión (10^{-1}) a un tubo con 9 mL de diluyente, mezclar bien (10^{-2}) y repetir la operación para obtener sucesivamente otras diluciones hasta 10^{-5} . Luego diluir al $\frac{1}{2}$. Sembrar 0,1 mL de la última dilución en la superficie de cada placa de agar para recuento.

Exponer una placa destapada a la luz ultravioleta y otra a la luz fluorescente, durante 5 minutos. Colocar las tapas e incubar a 35°C durante 24 hs.

Contar las colonias. Si la reducción del número de colonias en las placas expuestas a la luz UV es menor al 80% se debe reemplazar la lámpara (2).

DILUYENTE. Peptona 1 g, cloruro de sodio 9 g, agua 1 litro. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos.

AGAR NUTRITIVO. Extracto de carne 3 g, peptona 5 g, agar 15 g, agua 1 litro. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos (1).

ESCALA DE MAC FARLAND. El tubo 1 se prepara mezclando 0,1 mL de cloruro de bario al 1% con 9,9 mL de ácido sulfúrico al 1%. La turbiedad corresponde a una suspensión de aprox. 3×10^8 ufc / mL (3).

En una cámara de seguridad de tipo I, el aire ambiente entra en la cámara y arrastra cualquier aerosol liberado de los

cultivos hacia el filtro absoluto que permite liberar aire limpio a la atmósfera. El flujo de aire se debe mantener entre 0,7 y 1,0 m/s, y si no se alcanza este nivel los filtros deben ser cambiados. La eficiencia de toda cámara depende del mantenimiento adecuado (4).

El interior de la campana se debe limpiar y desinfectar después de usarla. La eficiencia de la desinfección puede controlarse mediante el método de contacto directo.

Los filtros se deben revisar todos los meses para detectar obturaciones o acumulación de suciedad, y cambiarlos según sea necesario. El rendimiento de los filtros se verifica exponiendo al aire una placa de agar para recuento durante 1 hora y después de la incubación prácticamente no debe haber colonias. Si tres ensayos sucesivos indican la presencia de contaminación, se considera que la campana funciona deficientemente y se recurrirá al servicio técnico especializado.

La lámpara fluorescente se limpia cada dos semanas con un paño suave humedecido en alcohol. Cada tres meses hay que controlar la lámpara ultravioleta germicida, si emite menos del 80% de la intensidad teórica debe ser reemplazada. Se debe encender 10 minutos antes de utilizar la campana, estando ésta vacía (2), y apagarla al hacer los análisis.

Microscopio

Es preferible un microscopio estándar binocular, con objetivos y oculares que proporcionen aumentos de 40x, 100x, 400x y 1000x aproximadamente, un condensador con una abertura numérica de 1,25, un diafragma iris y el sistema de iluminación montado en la base. En los laboratorio que lleven a cabo procedimientos con colorantes fluorescentes, es imprescindible un microscopio de fluorescencia (2).

Una lupa binocular es conveniente para el examen de la morfología del cultivo y facilita el repique en una placa atestada de colonias (4).

Deben colocarse en una superficie exenta de vibraciones y no es conveniente cambiarlos de emplazamiento. Cuando no se utilicen se cubren con una funda para evitar el polvo.

Los lentes se deben limpiar, después de usarlos, con papel para lentes o algodón muy suave. El objetivo de inmersión se

limpia sin desmontarlo, con el solvente recomendado por el fabricante, generalmente etanol (2).

Material de vidrio

Conviene el fabricado con vidrio borosilicato de bajo contenido alcalino. Todos los materiales volumétricos deben estar acompañados de la certificación de calibración. Después de cada uso se revisan y descartan los que tienen bordes mellados o la superficie interna corroída. La punta mellada de una pipeta hará que los volúmenes vertidos sean inexactos. El gollete de los matraces se debe inspeccionar para detectar fisuras que puedan causar derrames y los tapones de plástico si son nuevos se lavarán con una solución detergente caliente para eliminar residuos tóxicos.

DETERMINACION DE RESIDUOS BACTERIOSTÁTICOS

A. Lavar 6 cajas de Petri con el procedimiento habitual del laboratorio.

B. Lavar 6 cajas de Petri con el mismo procedimiento y enjuagarlas doce veces con agua destilada.

C. Lavar otras 6 cajas pero no enjuagarlas.

Esterilizar las cajas por el procedimiento habitual.

Preparar una suspensión de un cultivo de *E. aerogenes* (ver pág 63), hacer diluciones decimales hasta 10^{-6} y luego diluir al $\frac{1}{2}$. Colocar en cada caja 1 mL de la última dilución, volcar 15 mL de agar para recuento fundido y enfriado a 45°C y mezclar cuidadosamente por desplazamiento horizontal. Incubar las placas a 35°C durante 48 hs.

Contar las colonias. Una diferencia $> 15\%$ entre **A** y **B** indica la presencia de residuos inhibitorios del detergente, y entre **C** y **A** demuestra que las propiedades inhibitorias del detergente desaparecen con el enjuague ordinario (2).

Como los residuos ácidos o alcalinos pueden permanecer el el material de vidrio después del lavado, se verifica el pH de algunos objetos con el indicador azul de bromotimol (azul de bromotimol 0,1 g, hidróxido de sodio 0,01 N 16 mL, agua destilada 250 mL) que es amarillo a pH 6,5, azul a 7,3 y verde en el intervalo. También se deben analizar para detectar posibles sustancias antimicrobianas que puedan haberse adherido a la superficie interna (3).

Material de plástico

Hay dos categorías, descartable y esterilizable.

El material descartable, tal como cajas de Petri, recipientes para muestras, puntas de pipetas automáticas, etc. reduce el tiempo empleado en las tareas de limpieza, pero complica la eliminación una vez usado.

El material recuperable, por ejemplo cajas de Petri de policarbonato, puede ser esterilizado en autoclave (4).

PRODUCTOS QUÍMICOS / MEDIOS / REACTIVOS

Es preferible emplear medios deshidratados comerciales, con la fecha límite de validez, para lograr una uniformidad metodológica. Nunca se deben adquirir frascos de medios que no serán usados dentro del año, debido a las características higroscópicas de los mismos.

En los rótulos se coloca la fecha de apertura de los frascos. Los medios que se hayan alterado por absorción de humedad o presentan un cambio de color, se descartan. Cada tres meses se debe hacer un inventario y los medios que hayan excedido su fecha de validez se retiran.

El uso de los productos deshidratados comerciales no evita la necesidad de probar los lotes nuevos de medios selectivos antes de utilizarlos, cultivando un microorganismo testigo y comparando los recuentos, el tamaño y la apariencia de las colonias con los observados en un medio satisfactorio, no debiendo diferir los valores en más de 10% (2).

También se puede hacer la comprobación sembrando inóculos insignificantes de por lo menos cinco cepas de los microorganismos para los que el medio es selectivo, e inóculos masivos de cinco cepas de los microbios a suprimir (4).

Los compuestos químicos que se utilizan en los medios pueden contener impurezas inhibitoras o estimulantes del crecimiento microbiano, por lo que deben ser de calidad analítica. En cuanto a los colorantes tienen que ser certificados pues la variación entre los lotes, en cuanto a pureza y tipo de sustancias acompañantes, es grande.

Uno de los factores más importantes de la preparación de medios y reactivos microbiológicos es la calidad del agua utilizada. Se debe emplear agua destilada o desionizada, salvo

que se indique otra cosa como, por ejemplo en algunos medios micológicos. Los fluoruros no se eliminan con la destilación (2).

IDONEIDAD DEL AGUA

Preparar la solución concentrada del medio mínimo con agua recién obtenida en destilador de vidrio. Recoger unos 200 mL del agua desconocida y 200 mL de agua de control. Colocar en un fresco 20 mL de agua de control y 10 mL de solución, y en otro 20 mL del agua desconocida y 10 mL de solución. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos.

Preparar una dilución 10^{-6} de un cultivo de *E. aerogenes* (ver pág 65). Sembrar 1 mL en cada frasco e incubar a 35°C durante 24 hs.

Hacer diluciones decimales sucesivas de cada frasco y sembrar 0,1 mL en sendas placas de agar para recuento. Incubar a 35°C durante 24 hs. Contar las colonias.

Si la relación recuento agua desconocida/ recuento control es
 < 0,8 - se encuentran sustancias inhibitoras en el agua,
 0,8 a 1,2 - no hay inhibidores presentes,
 > 1,2 - se hallan fuentes estimuladoras del crecimiento.

MEDIO MÍNIMO CONCENTRADO. Citrato de sodio dihidrato 0,58 g, sulfato de amonio 1,2 g, sulfato de magnesio heptahidrato 0,52 g, cloruro de calcio dihidrato 0,34 g, cloruro de sodio 5,0 g, sulfato ferroso dihidrato 0,46 g, fosfato dipotásico 1,36 g, agua destilada 1 litro (2).

La mayoría de los medios microbiológicos se esterilizan con un tratamiento en autoclave a 120°C. Algunas sustancias sensibles al calor como los azúcares se deben tratar a una temperatura menor, o por poco tiempo, o ambas cosas a la vez.

Los tapones a rosca se deben aflojar antes de introducir el medio en el autoclave, para que el vapor pueda penetrar en el contenido. Como medida adicional de protección contra la contaminación posterior a la esterilización, los tapones de algodón se protegen con papel poroso antes del tratamiento en autoclave. En cuanto el manómetro de la cámara de presión vuelve a cero, se saca el medio del autoclave (2).

Después del tratamiento en autoclave, los tubos para fermentación, con ampollas invertidas en su interior, se revisar para asegurarse que no haya burbujas de aire (4).

Los materiales sensibles al calor se esterilizan por filtración. Los filtros tampoco deben contener sustancias inhibitorias o estimulantes del crecimiento microbiano. El flujo a través del filtro ha de ser como mínimo de 55 mL /min /cm² a 25°C. Los filtros deben soportar el tratamiento en autoclave a 120°C durante 10 minutos.

Como algunos reactivos se autoesterilizan, por ejemplo ciertas soluciones colorantes, se preparan añadiendo el colorante al recipiente con agua esterilizada.

Los medios deshidratados y los productos químicos se almacenan en lugares secos, frescos y protegidos de la luz y el polvo. Los medios preparados en tubos con tapón a rosca, bien cerrados, se pueden almacenar a 4°C durante 3 meses, los que llevan tapón de algodón no más de 1 semana (2).

METODOLOGÍA

Abundan los métodos microbiológicos. El empleo de métodos diferentes para analizar un determinado alimento suele conducir a resultados diferentes. Los microbiólogos deben conocer la finalidad y las aplicaciones de los principales manuales de análisis microbiológico de los alimentos, entre ellos están:

- AOAC International. 1998. Official Methods of Analysis, 16^a ed, 4^a rev. Gaithersburg.
- APHA. 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4^a ed. Downes FP, Ito K, editores. Washington.
- ICMSF. 1982. Microorganismos de los Alimentos, vol I. Acribia, Zaragoza.
- Mossel DAA *et al.* 2003. Microbiología de los Alimentos. 2^a ed. Acribia, Zaragoza, cap. 9: Procedimientos normalizados y validados.

Todas las técnicas analíticas presuponen que el analista ha sido instruido adecuadamente en las prácticas microbiológicas de laboratorio y se ha familiarizado con las técnicas de seguridad empleadas cuando se manipulan microorganismos patógenos (1).

Antes que un método sea utilizado corrientemente en un laboratorio, debe ser convalidado. El método ha de facilitar datos con un grado predecible de precisión y exactitud cuando lo empleen analistas calificados. La precisión da la medida de

la variabilidad del método entre varios laboratorios. La exactitud indica el grado en que el método determina el verdadero nivel del microorganismo analizado. Ha de ser lo más rápido y sencillo que sea posible, sin dejar de reunir los requisitos de confiabilidad. El método no debe contener un secreto comercial (2).

El estudio en colaboración de muestras homogéneas, entre analistas competentes y experimentados de laboratorios independientes que obtienen resultados equivalentes, es el mecanismo empleado para validar un procedimiento. Siempre que sea posible el método a validar se compara con un método existente, empleando alimentos que están naturalmente contaminados con del microorganismo analizado.

Cuando se analizan las muestras desconocidas, el analista deberá seguir al pie de la letra el método recomendado, porque las modificaciones que parecen secundarias pueden poner en peligro los resultados del análisis (3).

DOCUMENTACIÓN

Se debe proceder a un registro sistemático y documentado de toda la información que tenga alguna relevancia práctica para los análisis realizados, y permita reconstruir una situación analítica mucho después de que se haya efectuado el trabajo.

La documentación es un mecanismo que colabora con la localización de una muestra de laboratorio desde que se recoge hasta que se elimina. La secuencia de registros deben constituir un cuerpo continuo que proporcione un historial claro, exacto e indiscutible de la muestra, sin discrepancias.

Los datos de la garantía de calidad (calibración, mantenimiento o reparación de un equipo; preparación de medios y reactivos; control microbiológico del aire; etc) deben registrarse en el cuaderno de notas y no en las fichas de análisis de las muestras (3).

El manual de procedimientos operativos normalizados es el documento más importante para el mejoramiento y mantenimiento de la calidad del servicio, y es esencial para la acreditación del laboratorio microbiológico de alimentos.

Debe cumplir con los siguientes criterios:

- *Autoridad.* Debe ser recopilado por un profesional con experiencia práctica en los métodos. No es conveniente el uso exclusivo de los catálogos comerciales.
- *Factibilidad.* Debe ser claro, conciso y explícito en la descripción de los procedimientos, numerando las etapas.
- *Actualización.* Debe ser formalmente revisado todos los años y corregido si es necesario.
- *Disponibilidad.* Debe estar al alcance de todos los analistas del laboratorio, los que deben apegarse a las reglas (1).

REFERENCIAS

1. Collins CH *et al.* 1999. Microbiological Methods. 7^a ed. Butterworth-Heinemann, Oxford, pp 11, 19, 39.
2. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 1992. La Garantía de la Calidad en el Laboratorio Microbiológico de Control de los Alimentos. Roma.
3. Downes FP, Ito K, editores. 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4^o ed. American Public Health Association, Washington, pp 1, 13, 25.
4. Mossel DAA *et al.* 2003. Microbiología de los Alimentos. 2^a ed, Acribia, Zaragoza, p 585.
5. Carrillo L. 2005. Manual de Microbiología Agrícola. Ediunju, Jujuy, p 51.