



Las Buenas Prácticas de Laboratorio y Metrología Aplicada en Laboratorios de Microbiología de Alimentos

2025

LAS BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO Y METROLOGÍA APLICADA EN LABORATORIOS DE MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS

LAS BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO Y METROLOGÍA APLICADA EN LABORATORIOS DE MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS

Autores:

Fabiola Rojas Cornejo
Soraya Sandoval Riquelme
Lorena Morales Valenzuela
María Luisa Benítez Cisternas

Comité Editorial:

Soraya Sandoval Riquelme
Marcelo Soto Varas
Catherine Cáceres Saavedra

Agradecimientos:

Por el apoyo de César Conejeros, Leonardo Farías, Karina González, Richard Inostroza, Ricardo Budini y Alejandro Tapia.

Diseño y diagramación de imágenes:

Luis Núñez Rojas - Unidad de Comunicaciones e Imagen Institucional
Soraya Sandoval Riquelme - Subdepartamento de Metrología

Fotografías:

Lorena Morales
Soraya Sandoval Riquelme

Editor:

Instituto de Salud Pública de Chile
Av. Marathon 1000, Ñuñoa, C.P. 7780050, Santiago, Chile.
ISBN: 978-956-770-14-4 (digital)

Santiago de Chile, año 2025

Distribución gratuita. Se autoriza el uso de este documento con fines de divulgación científica, educativos y de capacitación, siempre que se reconozca la fuente. Se autoriza su reproducción total o parcial, siempre que se cite la fuente, excepto para fines comerciales.

Como citar este documento:

Rojas, F., Sandoval, S., Morales, L., Benítez M. Las buenas prácticas de laboratorio y metrología aplicada en laboratorios de microbiología de alimentos. Santiago: Instituto de Salud Pública de Chile; 2025. 125p.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
SIGLAS Y ACRÓNIMOS.....	3
IMPORTANCIA DE LAS MEDICIONES ANALÍTICAS PARA LA SEGURIDAD ALIMENTARIA	5
BIOMETROLOGÍA EN CHILE	7
BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO	11
ORGANIZACIÓN Y PERSONAL	17
1. ORGANIZACIÓN	17
2. PERSONAL	17
SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD	19
INSTALACIONES Y MEDIOAMBIENTE.....	21
1. INSTALACIONES	21
1.1. ÁREAS ASOCIADAS CON MUESTRAS Y ENSAYOS	22
1.2. ÁREAS GENERALES.....	23
1.3. DISPOSICIONES SOBRE LAS INSTALACIONES	23
1.4. INFRAESTRUCTURA Y EDIFICACIÓN	23
2. CONDICIONES AMBIENTALES.....	24
BIOSEGURIDAD Y BIOCUSTODIA	33
1. PRÁCTICAS DE BIOSEGURIDAD:	36
2. LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN	38
3. ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL Y EQUIPOS DE SEGURIDAD	38
4. FICHAS DE DATOS DE SEGURIDAD	41
5. GESTIÓN DE RESIDUOS	41
EQUIPAMIENTO	43
1. HISTORIAL DE LOS EQUIPOS	43
2. MANTENIMIENTO, VERIFICACION Y CALIBRACION DE EQUIPOS.....	44
INSUMOS, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO	55

1. AGUA GRADO REACTIVO	57
2. MEMBRANAS FILTRANTES	60
3. MATERIAL DE VIDRIO Y OTROS SUMINISTROS	61
4. SOLUCIONES TAMPÓN PARA MEDICIÓN DE PH	62
5. MANIPULACIÓN Y PRODUCCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y OTROS PREPARADOS	63
MATERIALES DE REFERENCIA Y CULTIVOS DE REFERENCIA	73
1. PATRONES Y MATERIALES DE REFERENCIA	74
2. CEPAS DE REFERENCIA	77
GESTIÓN DE LA INFORMACION Y DATOS	86
MUESTRAS DE ENSAYO	89
1. MUESTREO	89
2. MANEJO E IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS	89
METODOS DE ENSAYOS	91
1. TIPOS DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS	93
2. VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE METODOS DE ENSAYOS	95
3. INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN	97
ASEGURAMIENTO DE LA VALIDEZ DE RESULTADOS	101
1. CONTROL DE CALIDAD INTERNO (CCI)	102
2. CONTROL DE CALIDAD EXTERNO (CCE)	103
EXPRESIÓN DE RESULTADOS E INFORMES DE ENSAYO	107
1. EXPRESIÓN DE RESULTADOS DE MEDICIÓN	107
2. INFORME DE ENSAYO	112
TERMINOLOGÍA	115
BIBLIOGRAFÍA	121

INTRODUCCIÓN

El Instituto de Salud Pública de Chile como Laboratorio Designado en Metrología y miembro de la Red Nacional de Metrología de Chile (RNM) y en su rol de Laboratorio de Referencia, entrega conocimientos y herramientas para apoyar la mejora y trazabilidad de las mediciones en los laboratorios de análisis microbiológico de alimento.

Esta guía tiene como objetivo, orientar a los laboratorios de microbiología de alimentos respecto a los controles de calidad para el aseguramiento metrológico de los resultados. Es esencial para ello, contar con un sistema de gestión de calidad bien establecido, tal como exige la norma ISO/IEC 17025. Esto permite garantizar la validez y confiabilidad de los resultados de ensayo entregados a cliente y partes interesadas, para fines de la toma de decisión.

Asimismo, los análisis microbiológicos en alimentos y aguas, requieren de las buenas prácticas de laboratorio, de un conocimiento técnico de los microorganismos de interés y de las técnicas utilizadas. Es fundamental realizar los ensayos de forma segura y rigurosa, controlando los factores que pueden influir en los resultados y su incertidumbre.

En este contexto, la Organización Mundial de la Salud OMS señala que las buenas prácticas de laboratorio, son un conjunto de prácticas y procedimientos de trabajo estandarizadas, que se aplica a todo tipo de actividades con agentes biológicos.

Esperamos que esta guía sea una contribución en el fortalecimiento y mejoramiento del aseguramiento de la calidad y confiabilidad metrológica en los laboratorios que analizan muestras de alimentos y aguas.

SIGLAS Y ACRÓNIMOS

ANFOR	<i>Association Française de Normalisation</i>
AOAC	<i>Association of Official Analytical Collaboration International</i>
APHA	<i>American Public Health Association</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAM	<i>FDA's Bacteriological Analytical Manual</i>
BIMP	<i>Bureau International des Poids et Mesures</i>
BPPM	Buenas Prácticas y Procedimientos Microbiológicos
BRC	<i>Biological Resources Center</i>
BPL	Buenas prácticas de laboratorio
BSL	<i>Biosafety Level</i>
CAWG	<i>CCQM Working Group on Cell Analysis</i>
CBS	Cabina de Bioseguridad
CCE	Control de calidad externo
CCI	Control de calidad interno
CCINFO	<i>Culture Collections Information Worldwide</i>
CCQM	<i>Consultative Committee for Amount of Substance: Metrology in Chemistry and Biology (CCQM)</i>
CEN	Comité Europeo de Normalización
DIN	<i>Deutsches Institut für Normung</i>
DSO	Departamento de Salud Ocupacional del Instituto de Salud Pública de Chile
ECCO	<i>European Culture Collections' Organisation</i>
EPP	Elementos de Protección Personal
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSIS	<i>Food Safety and Inspection Service</i>
IC	Infraestructura de calidad
ICMSF	<i>International Commission on Microbiological Specifications</i>
ID	Instituto Designado de Metrología
IDF	<i>International Dairy Federation</i>
INM	Instituto Nacional de Metrología
INN	Instituto Nacional de Normalización
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
ISP	Instituto de salud Pública de Chile
MO	Microorganismo
NAWG	<i>CCQM Working Group on Nucleic Acid Analysis</i>
NMKL	<i>Nordic Baltic Committee on Food Analysis</i>
NMP	Número Más Probable
MR	Material de Referencia

MRA	Acuerdo de reconocimiento mutuo
MRC	Material de Referencia Certificado
NC	No conformidad
NCh	Norma Chilena
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
RNM	Red Nacional de Metrología
RSA	Reglamento Sanitario de los Alimentos
OAS	<i>Organization of American States</i>
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAWG	<i>CCQM Working Group on Protein Analysis</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEEC	Programa de evaluación externa de la calidad
SI	Sistema Internacional de Unidades
UCS	Unidad de Coordinación y Supervisión de la RNM del INN
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV	Ultravioleta
VIM	Vocabulario Internacional de Metrología
WDCM	<i>World Data Centre for Microorganisms</i>
WFCC	<i>World Federation for Culture Collections</i>

IMPORTANCIA DE LAS MEDICIONES ANALÍTICAS PARA LA SEGURIDAD ALIMENTARIA

La seguridad de los alimentos tiene un impacto directo en la salud de las personas, de la población y afecta al crecimiento económico de la región. Es aquí donde la metrología que es la ciencia de las mediciones, abarca tanto las determinaciones experimentales como las teóricas en cualquier nivel de incertidumbre en cualquier campo de la ciencia y la tecnología y en la industria alimentaria. Para garantizar que los alimentos son seguros, se requiere verificar parámetros y requisitos donde, es necesario aplicar conceptos metroológicos a los análisis de alimentos para proporcionar métodos analíticos sensibles, precisos y estandarizados y armonizar su aplicación en los laboratorios.

El *Consultative Committee for Amount of Substance: Metrology in Chemistry and Biology* (CCQM) del *Bureau International des Poids et Mesures* (BIPM), en su estrategia 2021-2030, destaca como un desafío científico, económico y social de gran relevancia mejorar la comparabilidad general de las mediciones, normas y capacidades químicas y biológicas, permitiendo así a los Estados miembros y a las empresas relacionadas realizar mediciones con un alto nivel de confianza. Por lo tanto, para garantizar la seguridad alimentaria mediante mediciones confiables a lo largo de la cadena alimentaria, es necesario utilizar herramientas metroológicas adecuadas.

Cabe señalar que, el Acuerdo de Reconocimiento Mutuo (MRA, por sus siglas en inglés) de la Convención del Metro y la armonización de las normas de laboratorio facilitan el comercio internacional de productos y, en última instancia, mejorarán tanto la calidad de los productos alimenticios como la salud de la población en todo el mundo.

De esta forma, los tres pilares principales en los que se basa la metrología son la validación de métodos, la estimación de la incertidumbre de la medida y la trazabilidad metroológica. Es así, como los ensayos de aptitud, el uso de materiales y/o patrones de referencia trazables, los métodos de ensayos validados, las prácticas de muestreo estandarizadas y las calibraciones, permiten la comparabilidad y confiabilidad de las mediciones realizadas por el laboratorio.

La metrología asegura la comparabilidad y exactitud de las mediciones, lo que permite reducir gastos, mejorar la operativa de la infraestructura, avanzar la tecnología, alentando la cooperación, protegiendo el comercio y garantizar nuestra calidad de vida.

En términos generales, podemos resumir que la metrología aporta en la seguridad alimentaria en:

- Calibración de los instrumentos: Asegura que los equipos de medición reporten resultados, precisos y confiables.
- Control de calidad: Las mediciones precisas permiten verificar que los productos alimentarios cumplen con los estándares de calidad y seguridad establecidos.
- Cumplimiento Normativo: La metrología ayuda a cumplir con las normativas y regulaciones nacionales, internacionales; como las normas de calidad y las legislaciones específicas de seguridad alimentaria.
- Optimización de los Procesos: Medir y controlar variables críticas en los procesos de producción permite optimizar la eficiencia y reducir desperdicios, contribuyendo a una producción más sostenible y segura.
- Trazabilidad: La metrología permite la trazabilidad metrológica en las mediciones y en el proceso de producción facilita rastrear y verificar cada etapa.

En el campo de la biología y microbiología, si bien la medición celular (incluye procariotas) ha sustentado la vigilancia de patógenos para el diagnóstico de enfermedades durante muchos años, la aplicación de principios metrológicos al análisis celular en general sigue siendo un desafío debido a que:

- Muchos de los mensurandos utilizados de manera rutinaria están mal definidos con cadenas de trazabilidad incompletas o poco claros.
- La caracterización fisicoquímica y las mediciones biológicas funcionales a menudo no son correlativas, y las unidades de medición generalmente no pertenecen al SI.
- Muchas de las necesidades de medición de las partes interesadas en este sector aún están surgiendo.

Es así como, el gran desafío en el campo del análisis microbiológico en matrices de alimentos y aguas, está enfocado principalmente en:

- Monitoreo y seguridad ambiental (especialmente microorganismos patógenos en agua, suelo y como biopelículas en superficies)
- Seguridad alimentaria (especialmente patógenos transmitidos por alimentos para la salud pública; objetivos emergentes asociados con los movimientos hacia un sistema alimentario de economía circular).

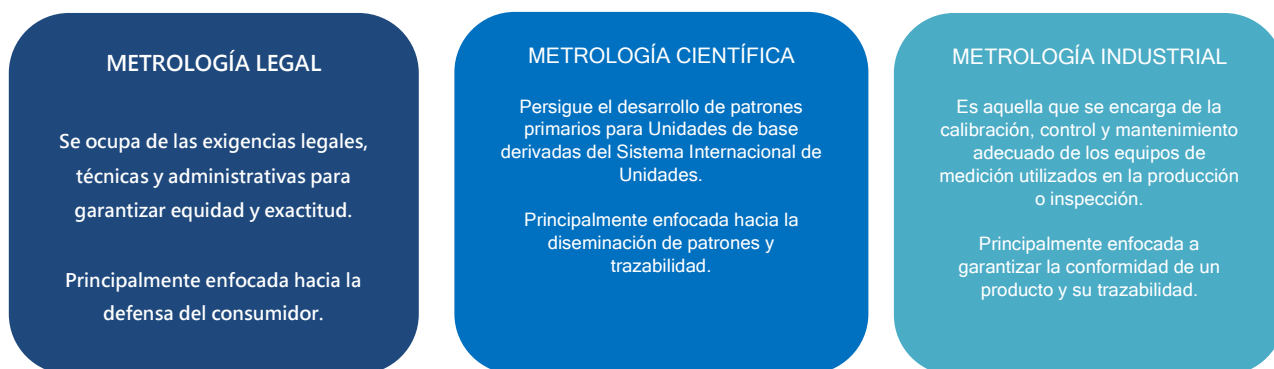
La correcta realización de las mediciones permite una toma de decisiones basada en evidencia científica confiable.

BIOMETROLOGÍA EN CHILE

La Metrología comprende los aspectos teóricos y prácticos relacionados con las mediciones. Es esencial para que las mediciones realizadas en un producto o proceso sean confiables. Las actividades principales de los organismos metrológicos en los diferentes países se refieren a:

- Definición de las unidades internacionales de medida.
- El establecimiento de las cadenas de trazabilidad de una medición.
- Diseminar el conocimiento sobre la metrología.

Los campos de la metrología son:



Campos de la metrología

La Metrología tiene un gran impacto en la sociedad y la industria, está en el Sistema de Aseguramiento de Calidad que permite garantizar la calidad de las mediciones realizadas a un producto o proceso. Es decir, es esencial en la Infraestructura de Calidad (IC) de un país.



Pilares de la infraestructura de la calidad

La Red Nacional de Metrología (RNM) en Chile, fue creada por el Estado de Chile para articular y administrar el Sistema de Aseguramiento Metrológico a nivel nacional, es una instancia tanto pública como privada que garantiza que las mediciones realizadas en nuestro país sean confiables, es decir: comparables, trazables y aceptadas en otros países.

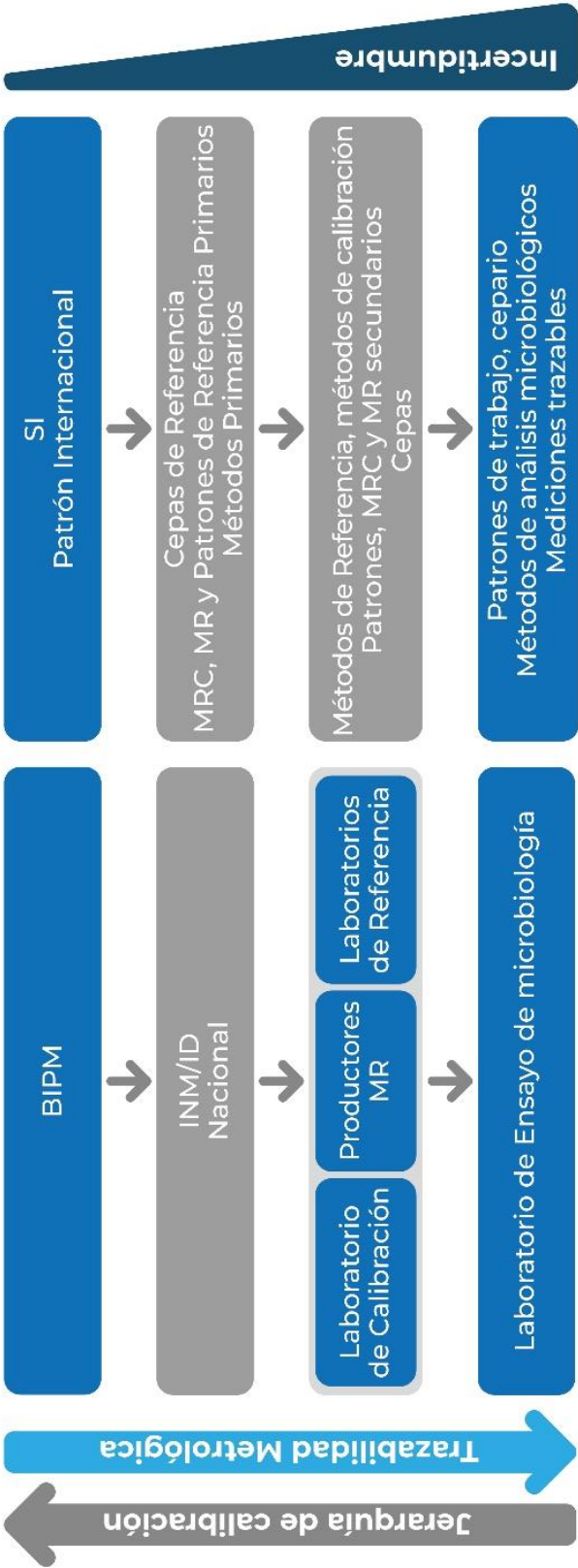
La Coordinación de la RNM está a cargo de la Unidad de Coordinación y Supervisión (UCS) de la Red Nacional de Metrología del INN. Su estructura es la siguiente:



Estructura de la Red Nacional de Metrología de Chile

Los Institutos Designados a nivel nacional, tienen como función el disseminar la metrología nacional y asegurar así la trazabilidad de las mediciones realizadas en el país, en el ámbito de la microbiología.

Trazabilidad metrológica en laboratorios de microbiología



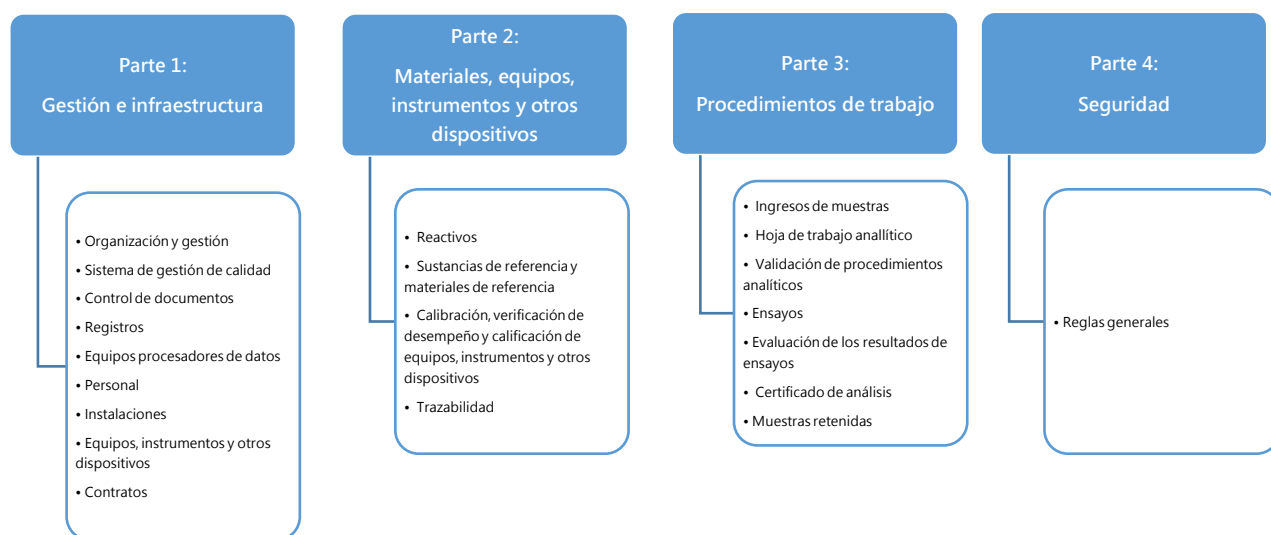
El Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), inició en el año 2007 el desarrollo e implementación de un Laboratorio de materiales de referencia para las áreas de alimentos y aguas. En el ámbito de la biometrología, entendida como la metrología enfocada a las mediciones biológicas, el ISP fue pionero en el país al establecer esta línea de trabajo en Chile, a través del desarrollo de materiales de referencia con trazabilidad a colecciones internacionales reconocidas de microorganismos, y la organización de rondas de ensayos de aptitud. Este hito permitió la creación de los laboratorios de metrología. La incorporación formal de esta línea de trabajo y la de química metrológica, en la estructura organizacional del ISP permitió su integración a la RNM, consolidando su rol en el desarrollo de la metrología en los alimentos a nivel nacional.

Actualmente, en el BIPM, en el Comité Consultor para Cantidad de Sustancia Metrología Química y Biología CCQM para el área biológica, integra tres grupos de trabajo afines en el ámbito de análisis celular (CAWG), molecular (NAWG) y de proteínas (PAWG). El Instituto de Salud Pública de Chile participa en los grupos de trabajo CAWG y NAWG, los cuales están definiendo las líneas de trabajo en el marco de la metrología en estas ramas y cómo se definirá su trazabilidad metrológica para fines del SI.

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO

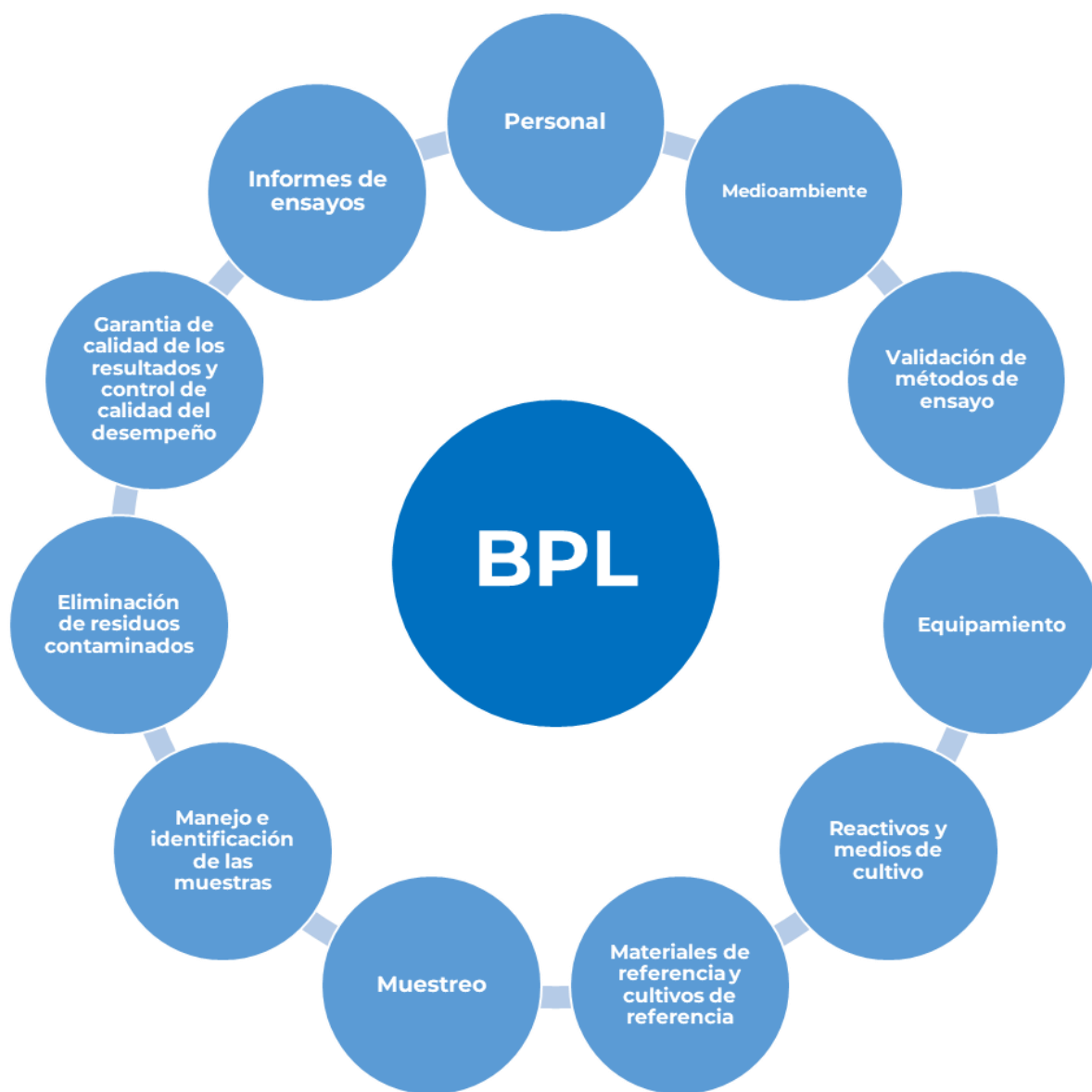
Las buenas prácticas de laboratorio (BPL), son un sistema de gestión de calidad que establece los criterios y procedimientos para planificar, realizar, supervisar, resguardar, informar y archivar estudios no clínicos de forma organizada y bajo condiciones específicas. El objetivo principal de las BPL es asegurar la confiabilidad, reproducibilidad y validez de los resultados obtenidos.

Las BPL de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos, es una directriz ampliamente adoptada por los laboratorios de ensayos no clínicos. Estas permiten establecer estándares que aseguran tanto la confiabilidad de los resultados analíticos como también el cumplimiento de aspectos de la bioseguridad. Esta cuenta con 4 partes que se pueden observar en la figura siguiente.



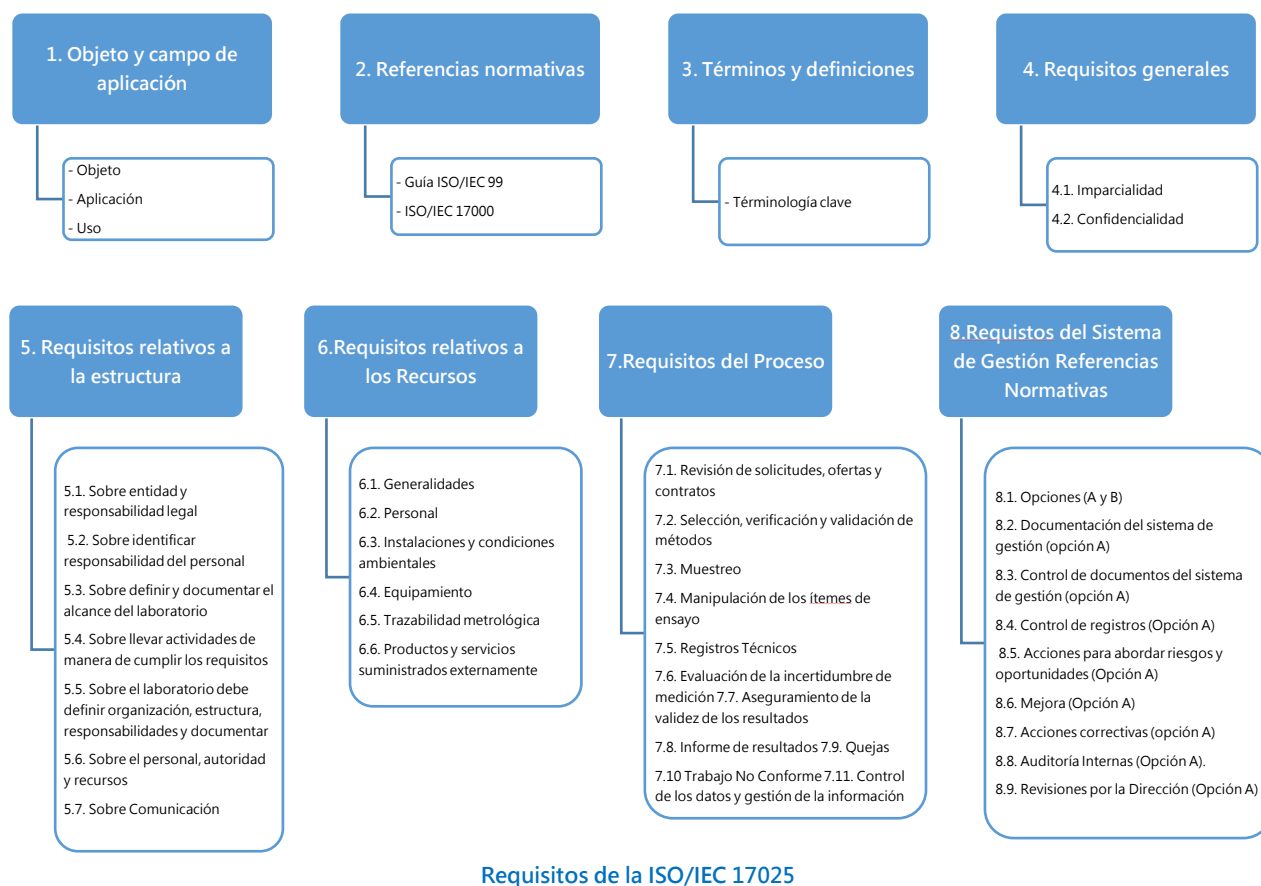
BPL de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) público el anexo 2 “Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica” , el cual, constituye una guía técnica que aborda diversos aspectos críticos relacionados con la gestión, operación y aseguramiento de la calidad en este tipo de laboratorios. Estos aspectos se resumen en la siguiente figura.



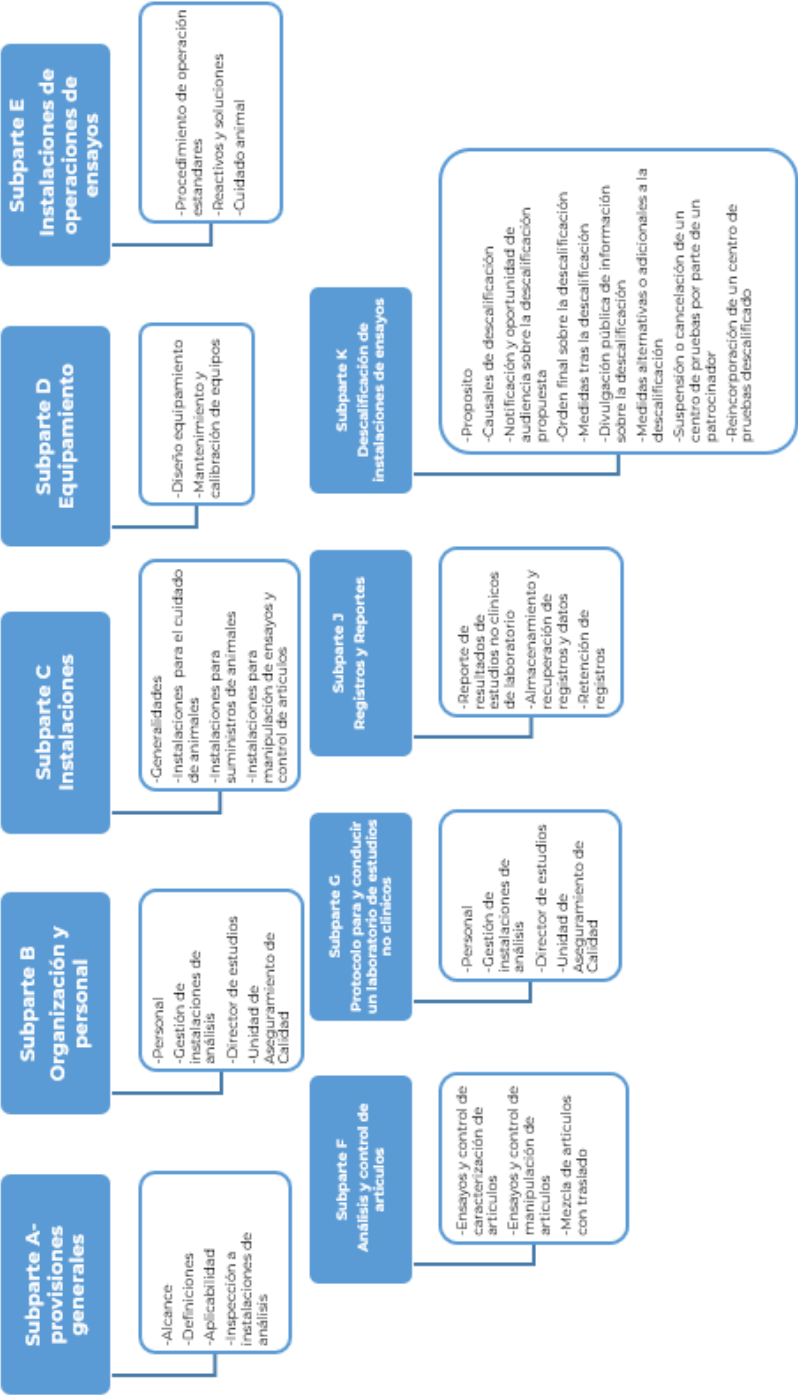
BPL para laboratorios de microbiología farmacéutica

En cuanto a la norma ISO/IEC 17025 establece los requisitos del sistema de gestión de calidad para los laboratorios de ensayos, al igual que las BPL, su propósito es garantizar la confiabilidad y capacidad técnica del laboratorio. Además, esta norma presenta varios puntos en común con los principios de las BPL, especialmente en lo relativo al aseguramiento de calidad, trazabilidad de los datos y validación de métodos. Ambos documentos hacen parte de un sistema de gestión del laboratorio y abordan aspectos generales y específicos.



Si bien la ISO/IEC 17025 establece requisitos técnicos y gestión, las BPL además de requisitos entrega indicaciones y se enfoca también a los aspectos de seguridad.

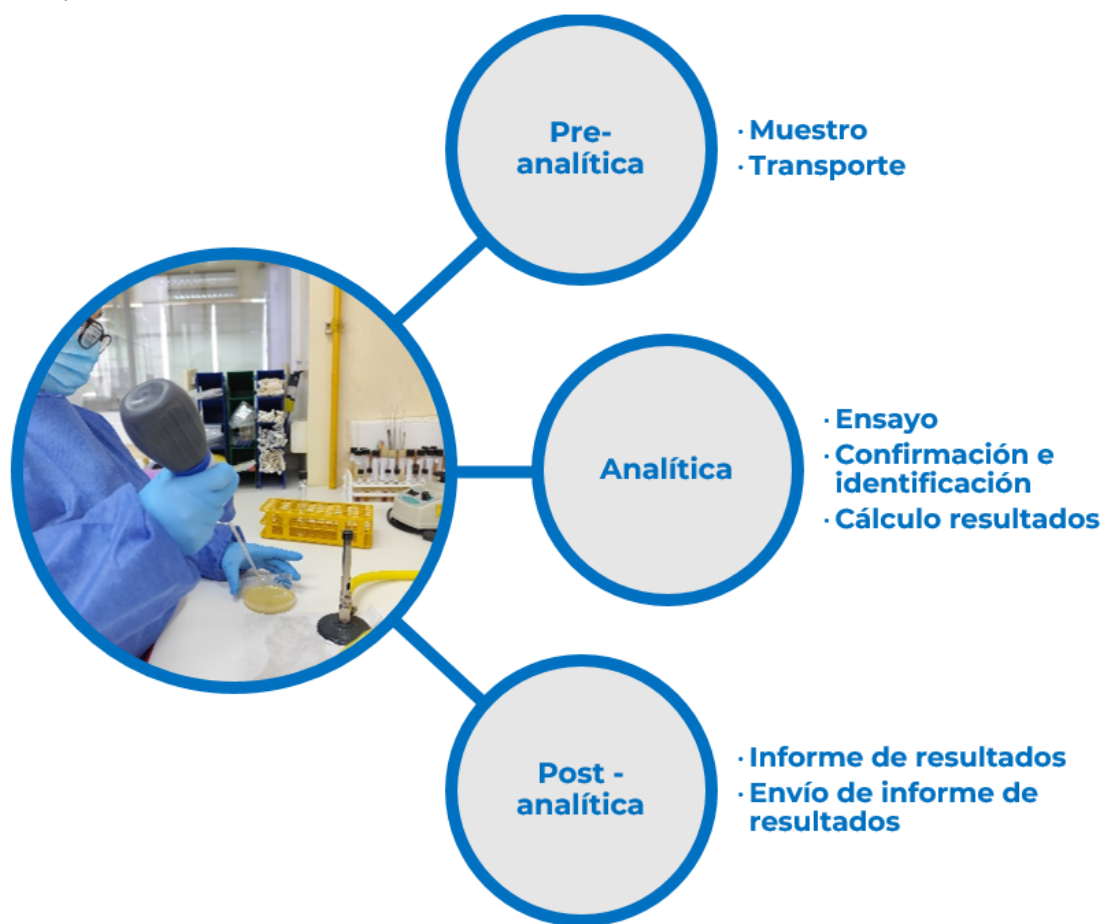
La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) ha establecido las *Good Laboratory Practice for nonclinical laboratory studies*, para estudios de laboratorio no clínicos, las cuales son ampliamente reconocidas a nivel internacional como referencia normativa. Estas directrices son particularmente utilizadas por laboratorios de ensayos en alimentos, en el ámbito de evaluación de riesgos alimentarios, en la industria farmacéutica, en especial por aquellos que desempeñan un rol de fiscalización.



Apartados de las BPL para estudios no clínicos

Por otro lado, la trazabilidad metrológica de las mediciones, tanto en la norma ISO/IEC 17025 como las BPLs destacan su importancia, ya que en ella se asegura la confiabilidad y comparabilidad de resultados de ensayos. La metrología como ciencia de las mediciones es fundamental en ello, y la formación del personal del laboratorio en esta materia es esencial.

Los laboratorios de análisis de alimentos deben cumplir con los requisitos de la ISO/IEC 17025, y es recomendable que cumplan con orientaciones entregadas por las BPL y al flujo de trabajo previamente planificado para lograr lo requerido bajo los estándares de calidad.



Esquema de las etapas del flujo analítico

ORGANIZACIÓN Y PERSONAL

1. ORGANIZACIÓN

El laboratorio debe constituirse como una entidad legalmente autorizada para funcionar y de este modo pueda asumir responsabilidad legal. Asimismo, debe contar con una estructura definida, disponer con el personal gerencial y técnico competente con la autoridad y recursos necesarios para desarrollar las funciones.

Es esencial para la confiabilidad del laboratorio, contar con el compromiso de imparcialidad, prevención de conflictos de interés y la confidencialidad de la información.

Respecto a la organización del laboratorio la estructura orgánica definida a través de un organigrama o matriz funcional, puede ayudar a una mejor comprensión de las relaciones jerárquicas y operativas dentro del laboratorio, facilitando la asignación de responsabilidades y la gestión eficiente de los procesos.

2. PERSONAL

El personal del laboratorio debe contar con la formación académica, calificación y competencia necesaria para el desempeño adecuado de sus funciones.

La formación en microbiología es esencial, tanto en las disciplinas clásicas como en biología molecular. Los analistas deberán recibir entrenamiento específico para la ejecución de los análisis de microbiología en alimentos, así como capacitación en bioseguridad y aspectos de biocustodia, conforme al perfil de cargo y las responsabilidades asignadas.

El Operador de Autoclaves debe contar con el certificado de competencia otorgado por la Secretaría Regional Ministerial (SEREMI) de Salud, para cumplir con esta función.

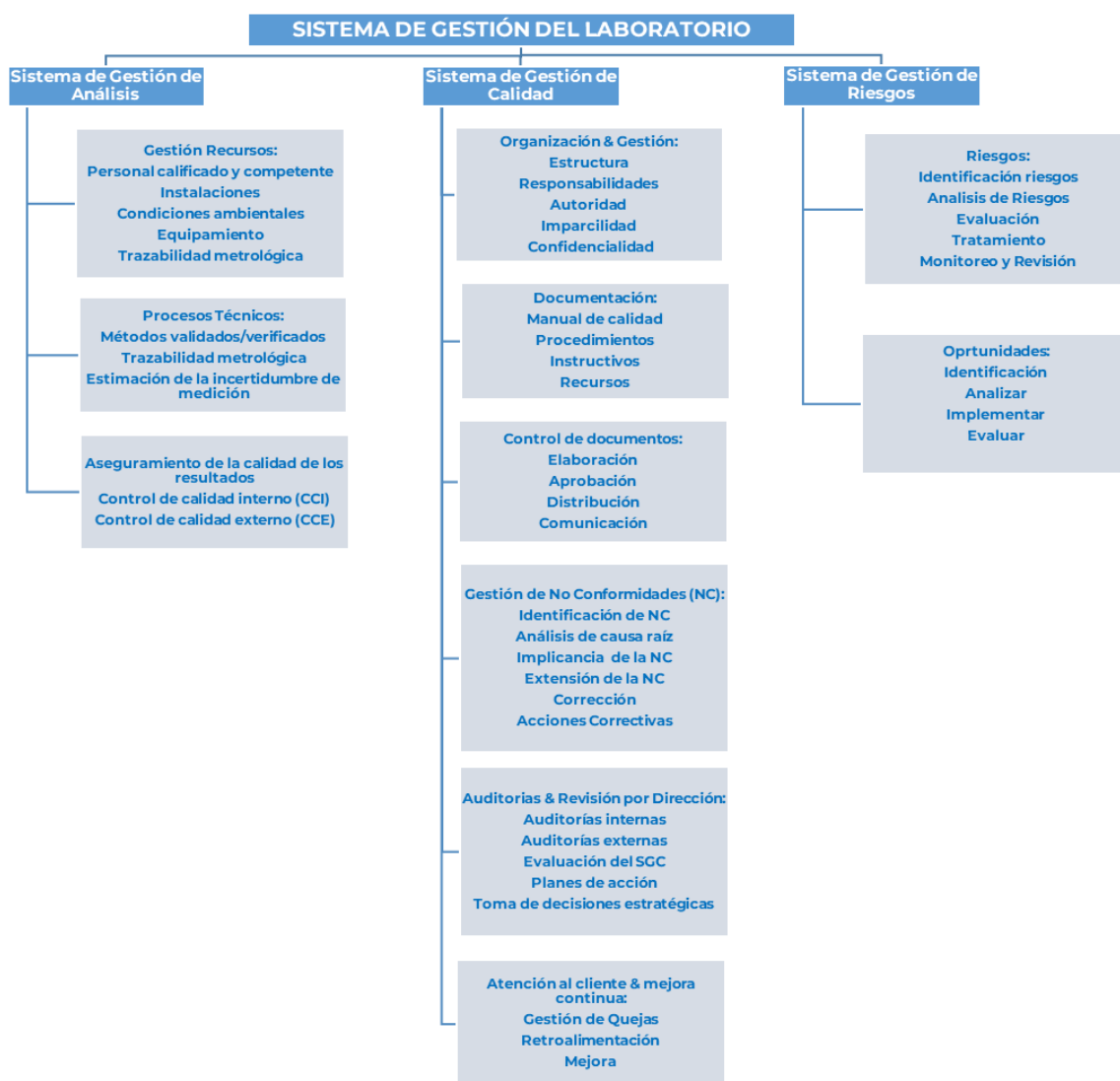
El laboratorio debe implementar un programa formal de capacitación continua. Estar claramente definidos los perfiles de cargo, las responsabilidades y criterios de evaluación de su desempeño. Además, el laboratorio debe demostrar la competencia del personal a través de los requisitos establecidos por los métodos de ensayos aplicados y de las actividades analíticas que realiza.



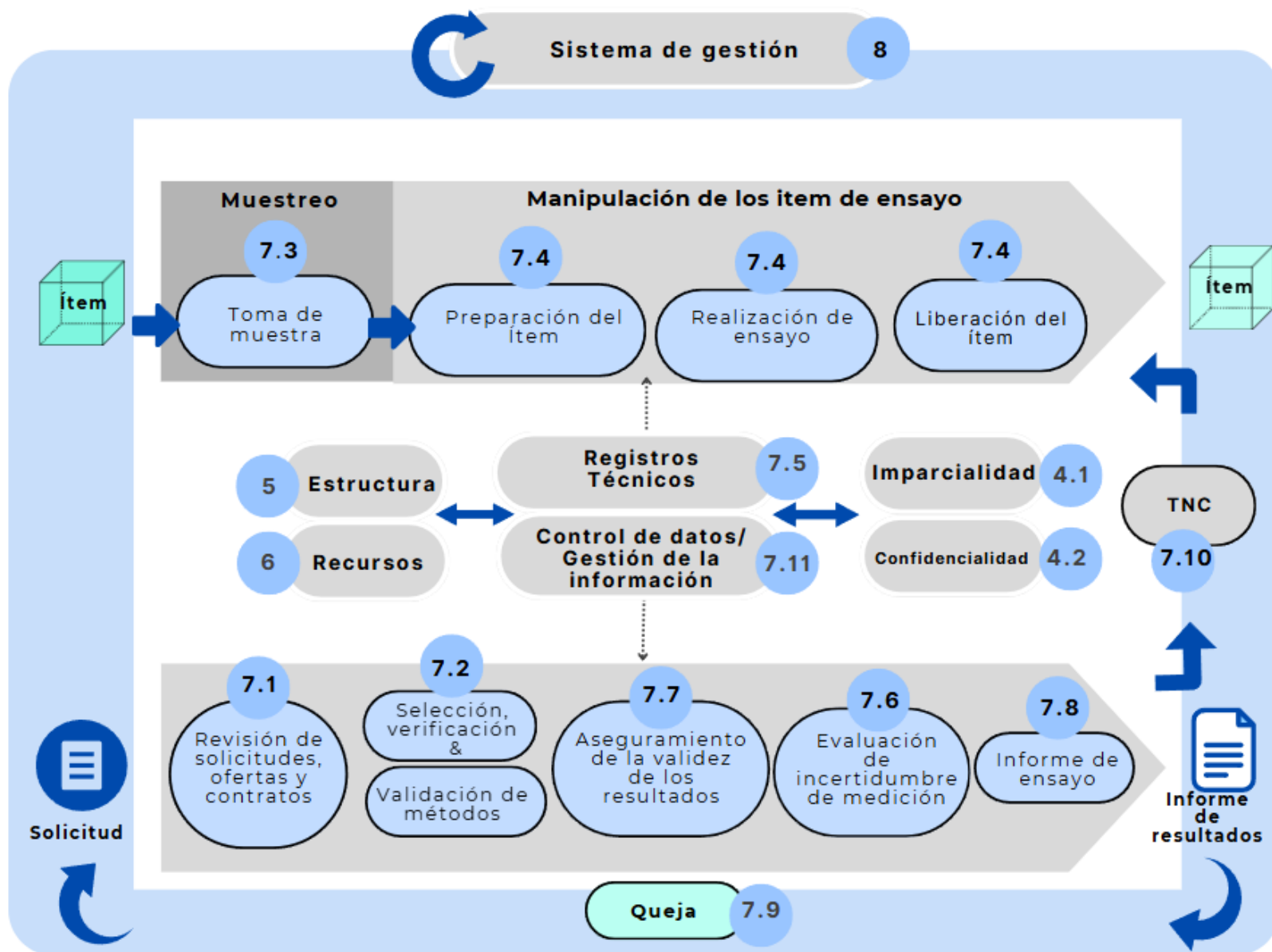
SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD

El laboratorio debe implementar un sistema de gestión de calidad conforme a los requisitos de la ISO/IEC 17025. Este sistema debe ser auditado, revisado y evaluado, a fin de asegurar que se cumple los requisitos para el fin previsto.

El Sistema de Gestión debe tener un enfoque hacia la mejora continua que permita asegurar el incremento de la eficiencia, la adaptación al cambio, la satisfacción del cliente, el cumplimiento normativo, una cultura organizacional positiva y una mayor ventaja competitiva.



Elementos claves de un sistema de calidad de laboratorio



Proceso de ensayo de laboratorio y la ISO/IEC 17025:2017

INSTALACIONES Y MEDIOAMBIENTE

El medioambiente del laboratorio hace referencia a las dependencias físicas destinadas a las actividades microbiológicas, las cuales deben estar adecuadamente equipadas y diseñadas para cumplir con los requisitos técnicos, condiciones ambientales y de bioseguridad. Es fundamental que ciertos equipos sean de uso exclusivo para microbiología, y que las áreas de trabajo estén físicamente separadas, con flujos operacionales definidos, a fin de prevenir la contaminación cruzada y minimizar los riesgos asociados a las actividades analíticas.

1. INSTALACIONES

Las instalaciones del laboratorio constituyen un elemento crítico para asegurar que tanto el equipamiento como las condiciones en las que se realizan los análisis son adecuados. Aspectos esenciales en el ámbito de la microbiología, donde se requiere un estricto control ambiental para garantizar la calidad de las mediciones de microorganismos.

La ausencia de condiciones apropiadas y de aseguramiento metrológico del equipamiento puede generar interferencias y errores en las mediciones, comprometiendo la validez, confiabilidad y trazabilidad de los resultados obtenidos.

En un laboratorio de microbiología, el acceso debe estar restringido al personal autorizado, quien debe estar debidamente informado y capacitado en relación con:

- Los procedimientos adecuados de ingreso y salida, incluyendo la vestimenta;
- el uso previsto de un área determinada;
- las restricciones impuestas al trabajo dentro de tales áreas;
- el fundamento por las cuales se imponen tales restricciones;
- y los niveles apropiados de contención.

Por consiguiente, el laboratorio comprende áreas separadas asociadas con muestras y ensayos y otras áreas generales.



Señal de acceso controlado y riesgo biológico en puerta de ingreso a laboratorio

1.1. ÁREAS ASOCIADAS CON MUESTRAS Y ENSAYOS

Es una buena práctica asignar salas separadas o áreas claramente designadas para este fin, con equipo exclusivo cuando sea necesario, para las siguientes actividades:

- Recepción y almacenamiento de muestras de laboratorio antes y después de los ensayos;
- preparación de muestras de laboratorio y porciones de ensayo (separados polvos y aquellas muestras que probablemente contengan una gran cantidad de microorganismos para reducir el riesgo de contaminación cruzada, y también alimentos comercialmente estériles para evitar la contaminación por otras muestras);
- análisis de porciones de ensayo desde la suspensión inicial, incluidos todos los pasos de dilución, siembra, incubación y recuento de los ensayos de enumeración y ensayos de detección hasta el aislamiento de patógenos presuntos;
- manipulación de patógenos presuntos, incluidos los procedentes de programas de ensayos de aptitud o muestras de laboratorio contaminadas deliberadamente con patógenos;
- manipulación y almacenamiento de cultivos de referencia y otras cepas de laboratorio;
- preparación y análisis de muestras mediante métodos de amplificación de ácidos nucleicos por PCR (consulte la norma ISO 22174 para obtener más detalles);
- preparación y esterilización de medios de cultivo, reactivos y equipos necesarios;
- almacenamiento de medios de cultivo y reactivos;
- descontaminación y eliminación de residuos de riesgo biológico;
- limpieza de material de vidrio y otros equipos;
- almacenamiento de productos químicos peligrosos, preferiblemente en armarios, habitaciones especialmente designados.



Las áreas analíticas deben estar debidamente señaladas, contar con el espacio y equipamiento necesario para realizar las actividades analíticas.

Las áreas pueden interconectarse siempre que se cumplan las recomendaciones de higiene y limpieza, si el espacio es limitado, las actividades pueden separarse por tiempo.

1.2. ÁREAS GENERALES

Se reservan áreas separadas para lo siguiente:

- Entradas, pasillos, escaleras y ascensores;
- guardarropas, baños y salas de personal;
- administración (por ejemplo, secretaría, oficinas, archivos de documentos);
- almacenamiento de suministros generales de laboratorio.

1.3. DISPOSICIONES SOBRE LAS INSTALACIONES

El laboratorio debe procurar que el entorno en el que se realizan los análisis microbiológicos sea seguro y no afecte la validez de los resultados de los ensayos, por lo que se dispondrá de instalaciones para evitar el riesgo de contaminación cruzada, por ejemplo:

- Construir el laboratorio de acuerdo con el patrón y el flujo de trabajo (principio de “no retorno”);
- llevar a cabo los procedimientos de manera secuencial utilizando las precauciones adecuadas para garantizar la integridad de los ensayos y de las muestras (por ejemplo, uso de recipientes sellados);
- separar las actividades por espacio o tiempo.

El laboratorio debe tener en cuenta:

- Evitar las condiciones como temperaturas extremas fuera del rango aceptado (18 °C a 27 °C), corrientes de aire, polvo, humedad, vapor, ruido, vibración, etc., que pueden afectar la validez de los resultados de las pruebas microbiológicas.
- Ubicar los flujos de aire dentro y fuera del laboratorio para minimizar el riesgo de contaminar las muestras de ensayo o cualquier instalación de procesamiento de alimentos adyacente.
- Disponer de suficiente espacio para que las áreas de trabajo se puedan mantener limpias y ordenadas.
- El espacio requerido debe ser proporcional al número de muestras y análisis, el número de personal y la organización interna general del laboratorio.

1.4. INFRAESTRUCTURA Y EDIFICACIÓN

Las instalaciones de ensayo deben construirse y equiparse de la siguiente manera para reducir el riesgo de contaminación por polvo y, por lo tanto, por microorganismos:

- Las paredes, los techos y los pisos deben ser lisos, fáciles de limpiar y resistentes a los detergentes y desinfectantes utilizados en los laboratorios.

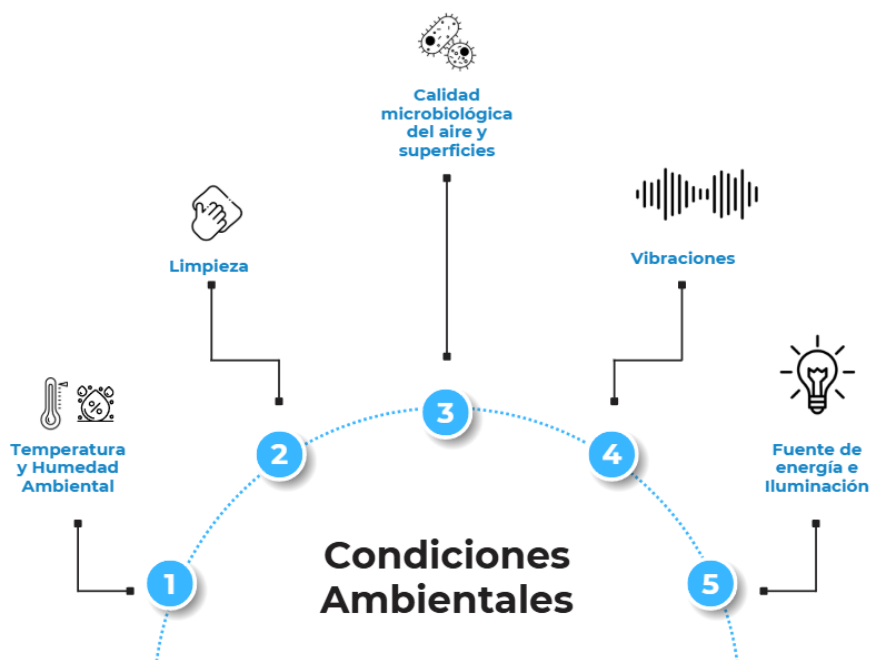
- Los pisos deben ser antideslizantes.
- Las tuberías elevadas no deben atravesar las instalaciones a menos que estén selladas o cerradas, al igual que cualquier otra estructura elevada que debe estar cubierta, a fin de que sea fácilmente accesible para su limpieza regular.
- Las ventanas y las puertas deben estar cerradas durante el ensayo para minimizar las corrientes de aire y la posible contaminación atmosférica. Deben estar diseñadas para evitar la formación de trampas de polvo y facilitar la limpieza.
- La temperatura ambiente y la calidad del aire (contenido de microorganismos, velocidad de propagación del polvo, etc.) deben ser compatibles con el ensayo. Los sistemas de aire acondicionado deben suministrar aire filtrado y deben limpiarse y revisarse o mantenerse regularmente.
- Se deben tomar medidas adecuadas, como estaciones de trabajo especiales, para minimizar la exposición y la contaminación cruzada por polvo al manipular medios de cultivo deshidratados y muestras polvorosas o en polvo.
- Cuando los ensayos se realicen en una atmósfera de baja contaminación, la sala debe estar equipada con un sistema de ventilación laminar limpio y/o una cabina de seguridad.
- Si es necesario, el entorno del laboratorio debe protegerse de los efectos nocivos de la radiación solar mediante el uso de vidrios de ventana con el tratamiento adecuado o persianas. Las persianas instaladas en el interior no son adecuadas, porque pueden ser difíciles de limpiar y pueden convertirse en una fuente de polvo.
- Los mesones deben ser de material liso, impermeable, que se limpie y desinfecte fácilmente.

2. CONDICIONES AMBIENTALES

Las condiciones ambientales de los laboratorios que normalmente deben ser consideradas son:

- Temperatura.
- Humedad.
- Limpieza de polvo y suciedad.
- Calidad microbiológica del aire y superficies.
- Vibraciones.
- Fuente de energía.
- Iluminación.

Los requerimientos de las condiciones ambientales son particulares para las actividades analíticas o procesos que se requieren en determinada sala o área, o cuando estas puedan influir en la calidad de los resultados y son consideradas magnitudes de influencia en la incertidumbre de la medición.



El laboratorio debe realizar el seguimiento, control y registro de las condiciones ambientales según lo requerido, el cual permita disminuir el efecto de estos factores en la precisión, exactitud y confiabilidad de los resultados.

Es importante considerar cuando se definan las condiciones ambientales de una sala, las condiciones de funcionamiento o requerimientos de instalación de los equipos.

Se deben registrar las condiciones ambientales de los laboratorios. Las cuales pueden ser medidas a través de un sistema de registro de datos en línea, manualmente a lo menos dos veces al día (de preferencia en la mañana y en la tarde), o según las exigencias técnicas establecidas.

a) Temperatura y Humedad

La temperatura requerida para realizar los análisis de microbiología, según la norma ISO 7218 "Microbiología de la cadena alimentaria: requisitos generales y guía para análisis microbiológicos", se recomienda una temperatura en las áreas de ensayos entre 18 °C y 27 °C.

En la sala de balanzas se recomienda una humedad relativa ambiental entre 45 %HR y 80 %HR sin condensación y una temperatura ambiente de 20 °C $\pm$ 5 °C, a fin de no afectar el proceso de pesada, sin embargo, se debe

considerar que si la balanza se ubica en la misma sala en la cual se realizan los análisis esta debe cumplir con la temperatura de 18 °C a 27 °C.

Las balanzas deben ubicarse en un mesón firme, que disminuya la presencia de vibraciones, alejados de radiación solar directa y corrientes de aire, por lo que debe estar ubicada lejos de las puertas, el acceso idealmente por puerta corredera, lejos de ventanas y fuentes de calor, incluido los ordenadores.

Otros equipos pueden tener requerimientos de temperatura y humedad diferentes para su operación de acuerdo a lo indicado por el fabricante.



b) Limpieza Y Desinfección

Se debe contar con un proceso de limpieza adecuado para el laboratorio, a fin de asegurar las condiciones adecuadas para realizar los ensayos, manipular las muestras, evitar contaminaciones cruzadas y proteger la salud del personal. Este proceso de limpieza deberá encontrarse documentado. Este proceso de limpieza debe considerar las instalaciones, los equipos, las superficies de trabajo, ventanas y muros según corresponda.



Los laboratorios para el desarrollo de los procesos analíticos en microbiología, se deben limpiar y desinfectar en húmedo. No está permitido barrer. Se limpia y descontamina antes de comenzar el proceso y después de realizar cada actividad o proceso analítico se descontamina nuevamente.

Es importante que la limpieza y desinfección de la sala comience con el área visualmente "más limpia" y continúe hacia el área "más sucia".

Los desinfectantes deben rotarse para evitar la resistencia en los microorganismos y se pueden incluir controles para la verificación del proceso como: Bioluminiscencia, métodos microbiológicos (control de aire, control de superficie), hisopados y otros.

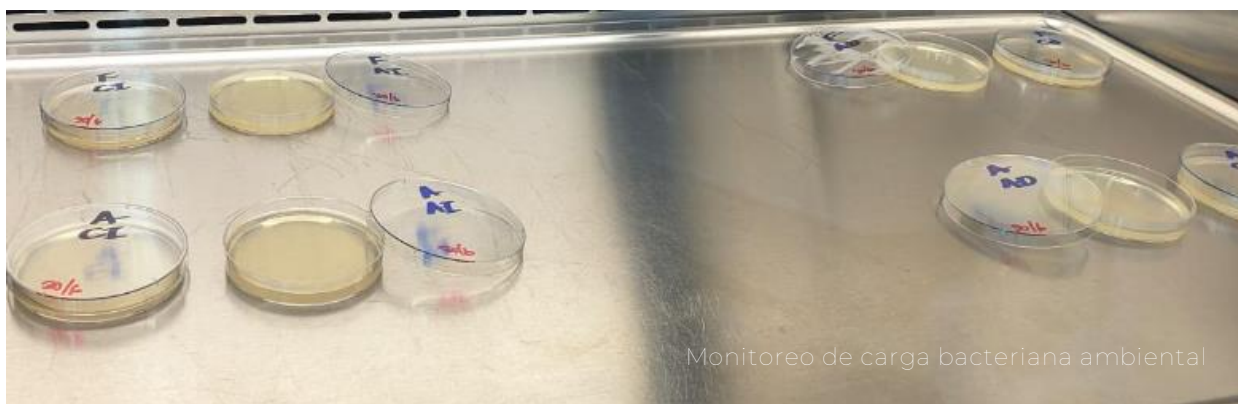
Se recomienda considerar los métodos, la frecuencia y los controles para la limpieza y la desinfección según el riesgo y verificar los siguientes puntos:

- Los pisos, paredes, techos, mesas de laboratorio, muebles y uniones entre estos deben mantenerse y repararse regularmente para evitar grietas que puedan albergar contaminación.
- Realizar una limpieza y desinfección periódicas para mantener las instalaciones en condiciones adecuadas para la realización de los ensayos. Las superficies contaminadas o potencialmente contaminadas deben descontaminarse utilizando un desinfectante que cuente con registro sanitario otorgado por el ISP, con propiedades bactericidas y fungicidas demostradas.

- Utilizar equipos de limpieza exclusivos para todos los laboratorios de microbiología, con equipos separados para las áreas de alto riesgo, como los laboratorios de patógenos.
- Mantener los sistemas de ventilación y cambiar los filtros de aire cuando sea necesario.
- Monitorear el nivel de contaminación microbiológica de las superficies de trabajo del laboratorio, las superficies de contacto del personal y el aire regularmente (con una frecuencia que depende de los resultados de los seguimientos anteriores y del riesgo para la validez de los resultados de los ensayos).
- Se recomienda evitar la acumulación de polvo en los laboratorios, en este sentido se pueden adoptar medidas sencillas, tales como: limpieza diaria de superficies y almacenamiento de papeles en el laboratorio, disponiendo de espacio suficiente para almacenar materiales, archivos, cuadernos, etc.

c) Calidad Microbiológica del Aire y Superficies

La calidad microbiológica del aire es un aspecto crítico en los laboratorios de microbiología, ya que su control es esencial para evitar contaminaciones. Para el monitoreo de carga bacteriana ambiental se recomienda verificar frecuentemente (mensual o trimestralmente) la calidad del aire de dichas salas, el cual será satisfactorio con un recuento de aerobios mesófilos de ≤ 15 UFC/placa/15 min de exposición.



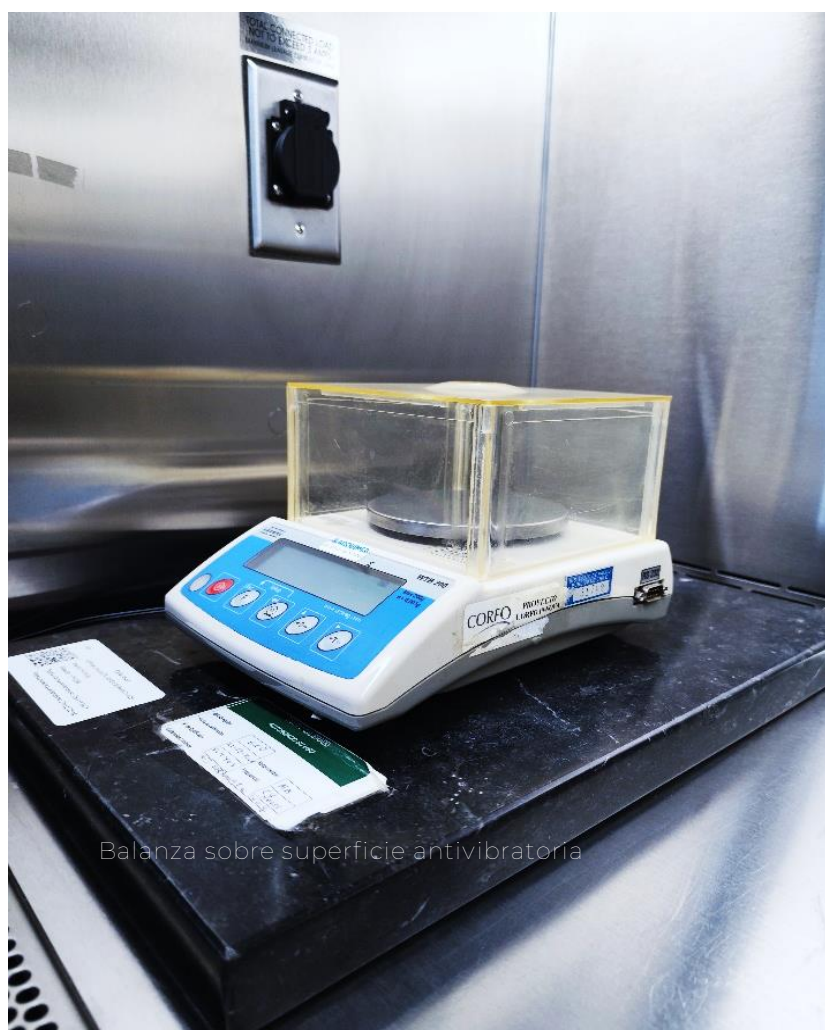
En el caso de las superficies de trabajo, entiéndase mesones de trabajo, superficies de equipos (incubadoras, refrigeradores, homogeneizadores, gabinetes, etc.) el recuento de aerobios debe ser de ≤ 25 UFC/25 cm². Para este análisis se puede utilizar el método del hisopado o el método de placas de contacto.



d) Vibraciones

Algunos equipos pueden generar vibraciones que interfieren en el funcionamiento de balanzas u otros instrumentos del laboratorio, lo que podría afectar la precisión e influir en los resultados de los ensayos.

Por requerimientos del ensayo una balanza puede ser instalada dentro de un flujo laminar o cabina de bioseguridad, para mitigar estas interferencias, se recomienda utilizar superficies o mesas antivibratorias que permitan asegurar condiciones de operación más estables y controladas.



e) Fuente De Energía

Es esencial que el suministro eléctrico del laboratorio sea estable y cuente con la capacidad requerida, para evitar afectaciones en equipos críticos como estufas, baños de incubación y sistemas de almacenamiento en frío destinados a la conservación de muestras, cepas y medios de cultivo.



Los equipos que tengan cables dañados o enchufes en mal estado o partes de los accesos eléctricos agrietados, deben retirarse del servicio de inmediato por “mal estado”.

El laboratorio se debe asegurar de que todos los tomacorrientes estén correctamente conectados a tierra.

Los enchufes deben estar ubicados de manera accesible y visible para los operarios.

Minimice los riesgos de derrames de agua cerca de los equipos eléctricos, que los tomacorrientes cerca de los baños de incubación o cerca de fregaderos tengan protección de circuito de falla a tierra, así se protege al usuario.

f) Iluminación

En cuanto a la iluminación, esta debe ser luz blanca en las salas del laboratorio, con el fin de asegurar una visibilidad adecuada durante la realización de los ensayos.

Muchos laboratorios emplean luz ultravioleta (UV) en salas de ensayo o cabinas de bioseguridad como complemento a la sanitización de las áreas de trabajo, ya sea antes o después de los ensayos. Para su asegurar su efectividad, es necesario evaluar su poder germicida, para el propósito previsto.



Se debe limpiar la superficie o CBS antes de la desinfección UV.

El tiempo de exposición de las superficies con luz UV es de 15 a 30 minutos.

Cuente con un registro para documentar la actividad, indicando fecha, hora y tiempo.

CONDICIONES AMBIENTALES SUGERIDAS EN LOS LABORATORIOS DE MICROBIOLOGÍA

Todas estas condiciones ayudan a asegurar que no se altere el trabajo analítico y sus resultados. La siguiente tabla presenta las condiciones ambientales recomendadas por el ISP para fines de la debida realización de los ensayos de microbiología de alimentos.

Tabla 1: Condiciones ambientales para laboratorios de microbiología de alimentos

Control	Requerimiento	Frecuencia
Temperatura Ambiente	+18 °C a +27 °C	Mínimo una vez al día cuando se realicen ensayos
Aire Ambiental	≤ 15 UFC/placa/15 min de exposición	Mensual o trimestral paralelo al ensayo
Calidad bacteriológica de superficies de trabajo	≤ 25 UFC/25 cm ³	Mensual o trimestral
Calidad bacteriológica de superficie interna de Equipos	≤ 25 UFC/25 cm ³	Trimestral o según necesidad del laboratorio
Poder germicida luz UV del GBS	≥ 99 %	Trimestral

BIOSEGURIDAD Y BIOCUSTODIA

Los laboratorios de microbiología deben cumplir con una serie de requisitos de **bioseguridad**, entendida como el conjunto de medidas destinadas a prevenir riesgos para la salud humana y el medio ambiente derivados de la manipulación de agentes biológicos.

El cumplimiento de las prácticas estándar de bioseguridad por parte del personal del laboratorio es fundamental para evitar situaciones que puedan comprometer tanto la seguridad de los analistas como la integridad del análisis y la trazabilidad de las muestras. A continuación, se describen algunas de estas prácticas esenciales:



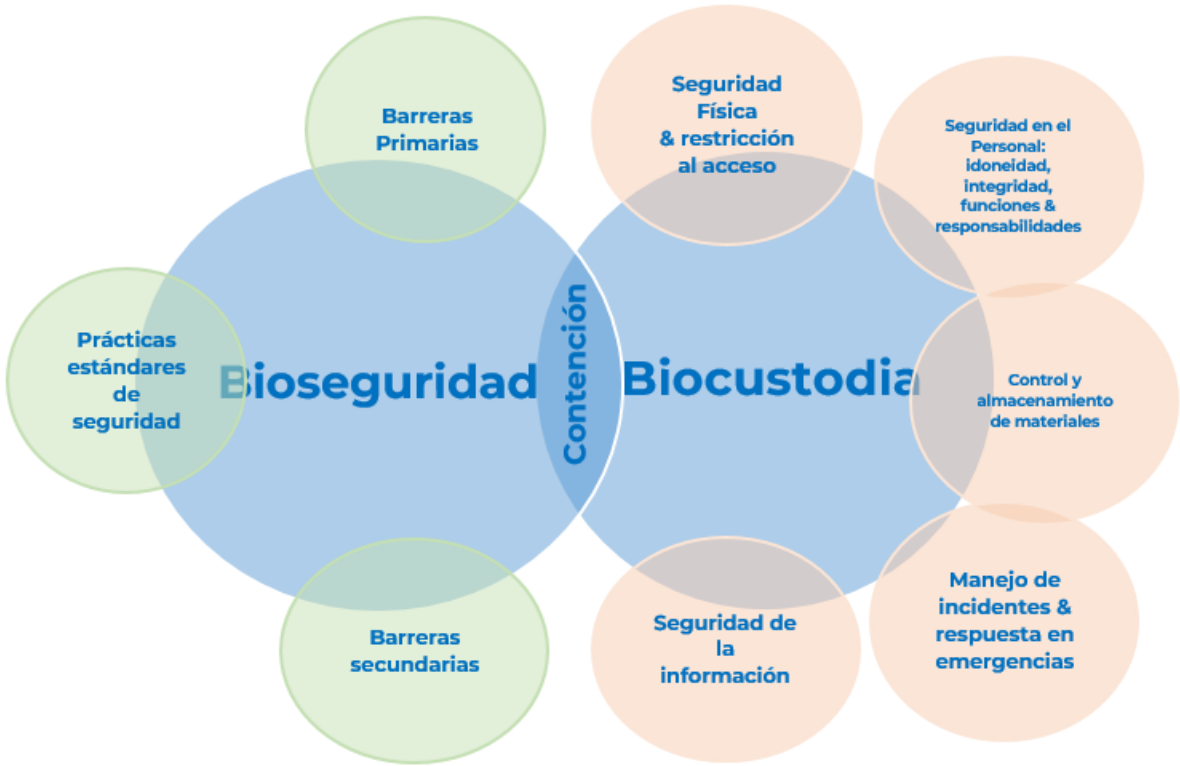
Señal riesgo biológico

Los laboratorios biológicos son diseñados y construidos de modo que cumplan su función prevista durante su utilización y a su vez, que la manipulación de agentes biológicos sea segura para el personal, medio ambiente y la comunidad general.

La bioseguridad del laboratorio es un proceso que está basado en la gestión del riesgo biológico, por lo que requiere de un programa de bioseguridad, es decir; contar con información de seguridad, equipamiento, elementos de protección personal y acciones definidas para abordar el peligro y controlar los riesgos en el laboratorio.

La **biocustodia** se define como la gestión destinada a prevenir la exposición de los animales, las personas y el medio ambiente a materiales biológicos nocivos y viceversa. La OMS la define como la gestión para prevenir la

pérdida, el robo, el uso indebido, la desviación o la liberación intencionada de agentes biológicos que se manipulan en un laboratorio.



Relación bioseguridad y biocustodia

Se debe tener presente que, al trabajar en un laboratorio de microbiología, la técnica aséptica es fundamental para el éxito y la seguridad de los ensayos/análisis. En general, las técnicas asépticas son procedimientos o procesos que realiza el personal técnico en condiciones estériles para garantizar que los contaminantes microbianos no dañen a al personal y no se introduzcan en soluciones estériles, suministros o cultivos experimentales.

En un laboratorio de microbiología, es importante mantener la salud y la seguridad de todo el personal. Para evitar riesgos para la salud, el personal de laboratorio debe usar equipo de protección y estar al tanto de los posibles peligros. El equipo de protección tiene dos propósitos: proteger de los peligros del laboratorio y proteger el ensayo de una contaminación no intencional.

Referente a las actividades en el laboratorio el personal debe cumplir con los requerimientos y especificaciones estandarizadas de bioseguridad e higiene como lo que se señala a continuación en la siguiente tabla.

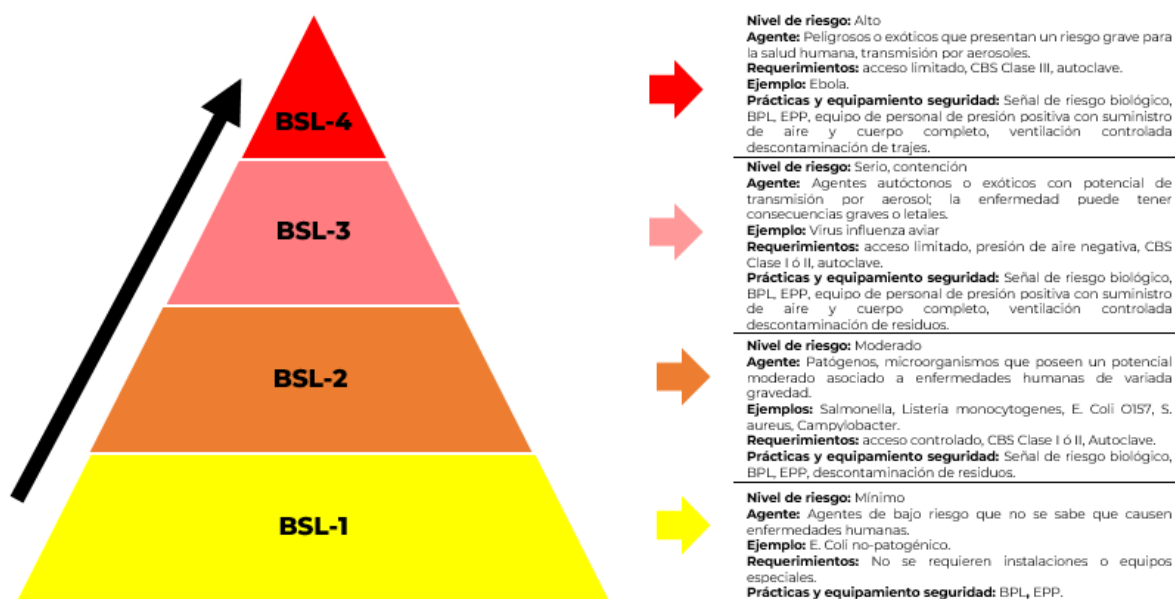
Tabla 2: Resumen Aspectos de Higiene y Bioseguridad en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos

Clasificación	Especificaciones
Normas generales de higiene	• Lavado de manos. • Uso de ropa de laboratorio (batas, guantes, gafas). • Limpieza y desinfección de superficies y equipos.
Manejo de residuos	• Clasificación de residuos (biológicos, químicos, comunes). • Procedimientos de eliminación de residuos. • Desactivación de residuos cortopunzantes y biosanitarios (incineración y/o esterilización).
Elementos de protección personal (EPP)	• Tipos de EPP (guantes, mascarillas, gafas, batas). • Uso correcto y mantenimiento de EPP. • Protocolos para colocar y retirar los EPP.
Control contaminación/ infecciones	• Técnicas de desinfección y esterilización. • Manejo de muestras biológicas. • Procedimientos en caso de derrames o accidentes.
Niveles de seguridad	• Clasificación de los laboratorios por niveles de bioseguridad (BSL-1, BSL-2, etc.). • Requisitos y medidas específicas para cada nivel.
Capacitación personal	• Programas de formación en bioseguridad. • Simulacros y prácticas de emergencia. • Actualización continua de protocolos y procedimientos.
Legislación y normativas	• Normativas nacionales e internacionales sobre bioseguridad. • Cumplimiento de regulaciones y auditorías. • Documentación y registros de bioseguridad.

1. PRÁCTICAS DE BIOSEGURIDAD:

Dependiendo del tipo de ensayos que se realicen, considerar las siguientes prácticas de bioseguridad:

- El acceso al laboratorio de microbiología debe controlarse o limitarse al personal autorizado por la jefatura o encargado del área cuando se están llevando a cabo experimentos ensayos o trabajos analíticos.
- Los laboratorios de microbiología en alimentos manipulan de manera rutinaria microorganismos de los niveles de bioseguridad BSL-1 y BSL-2.



Niveles de Bioseguridad de laboratorios

- El acceso debe ser restringido y autorizado al personal correspondiente. Se debe colocar a la entrada del laboratorio una señal de advertencia de "Riesgo Biológico" cuando esta sea pertinente.
- Todo personal debe ingresar con delantal de laboratorio (delantal de bioseguridad de tela o desechable). Usar un delantal de bioseguridad limpio te y de preferencia ajustado para evitar accidentes. Las batas de laboratorio nunca deben utilizarse fuera del laboratorio y cuando son de tela (reutilizables) deben limpiarse con frecuencia. Asegúrese de que las mangas y puños de su bata estén debidamente ajustadas para evitar accidentes.
- Al entrar y salir de un laboratorio, asegúrese de lavarse bien las manos con jabón antimicrobiano.

- Mientras esté en el laboratorio, evitar tocarse la cara o los ojos. Además, no manipular maquillaje ni lentes de contacto, ya que pueden contaminarse.
- Ingresar al laboratorio solo con zapatos cerrados. Nunca se deben usar zapatos abiertos en un laboratorio, porque el operador o analista queda susceptible a posibles cortes o infecciones por vidrio roto o equipo afilado.
- Manipular con cuidado y debida atención, las fuentes de calor o mecheros encendidos, no exponer cerca de materiales inflamables.
- Cuando se trabaje con microorganismos, usar guantes desechables ajustados. Las escamas de piel seca albergan bacterias, que pueden proporcionar una fuente de contaminación; usar guantes mitigará el riesgo. Además, los guantes desechables disminuyen el riesgo de infectar las heridas de las manos.
- Usar cubierta para el pelo y el cabello largo debe estar recogido para evitar accidentes y que este sea una fuente de contaminación durante la realización de los ensayos.
- Usar gafas protectoras o una pantalla facial cuando trabaje con materiales o cultivos peligrosos. Si sus ojos entran en contacto con microorganismos o productos químicos nocivos, lávese los ojos durante 15 min en un lavaojos y busque atención médica de inmediato.
- No almacenar ni manipular alimentos o bebidas en el laboratorio.
- No pipetear con la boca; se deben utilizar pipeteadores para aspirar líquidos.
- Minimizar salpicaduras o generación de aerosoles, teniendo el debido cuidado al realizar actividades de ensayo y manipulación de muestras o cepas.
- Se debe manejar de forma segura los objetos cortantes, vidrio roto o materiales punzantes, instalando contenedores para este tipo de material de vidrio roto o corto punzante contaminado y no contaminado.
- No está permitido el uso de dispositivos portátiles (teléfonos celulares, computadoras portátiles u otros dispositivos) que no sean estrictamente necesarios para realizar las actividades propias del laboratorio. Debido a que estos pueden causar problemas de contaminación cruzada y desconcentración. Cuando se deban usar por razones analíticas, se debe asegurar que estén protegidos por una barrera física (ejemplo: cubierta plástica) o que sean descontaminados de manera adecuada antes de abandonar el laboratorio.
- Se deben proteger los documentos físicos mediante barreras (como fundas de plástico), para evitar su contaminación.
- Las superficies de trabajo se descontaminan como mínimo una vez por día, antes y después de realizar una actividad analítica, y cuando ocurra un derrame.
- Los métodos de descontaminación de material o desechos deben ser adecuados y seguros para este fin, por ejemplo; uso de autoclave.
- Los materiales enviados a descontaminar fuera del laboratorio deben ser depositados inmediatamente en recipientes adecuados para tal efecto (para su transporte desde el laboratorio), es decir; un recipiente resistente, estanco y con tapa, es decir; se embalan de conformidad con las normas aplicables antes de retirarlos del establecimiento.

Considerar la debida importancia a:

- Mantener cubiertas la boca, nariz y piel con los elementos de protección personal (EPP), para evitar la propagación de las partículas.
- Mantener en lo posible una distancia de 2 m lineales entre analistas.
- Siempre trabajar de manera planificada y ordenada para evitar errores y desvíos.

2. LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN

Mantener el área de trabajo limpia y desinfectada, esto es esencial para prevenir la contaminación cruzada y evitar la alteración de cultivos o interferencias en los ensayos. Una superficie contaminada puede comprometer la validez de los análisis realizados.

- Antes y después del uso, desinfectar todas las superficies de trabajo con etanol al 70 % o un desinfectante adecuado (ejemplo solución hipoclorito de sodio al 0,1 %). Esto es especialmente importante después de cualquier derrame.
- Mantener un espacio de trabajo ordenado; todas las superficies de trabajo sólo deben contener el equipo necesario para el análisis.
- Asegurarse de tener todos los suministros necesarios antes de comenzar un análisis. Estar preparado reducirá la probabilidad de contaminación por descuido.
- El trabajo se puede realizar en un gabinete de bioseguridad. Los gabinetes de bioseguridad se pueden desinfectar con luz ultravioleta junto con etanol al 70 % o un desinfectante adecuado.
- No abrir ventanas ni utilizar ventiladores que hagan circular el aire exterior. Si es posible, trabajar en entornos de laboratorio que tengan rejillas de ventilación cubiertas con filtros. Esto evitará la contaminación de los cultivos por partículas transportadas por el aire.
- Limpiar con frecuencia los baños de agua utilizados para calentar medios o soluciones.
- Desinfectar de forma rutinaria las incubadoras utilizadas para evitar la propagación microbiana.

3. ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL Y EQUIPOS DE SEGURIDAD

El personal deberá hacer uso de los elementos de protección personal (EPP) correspondientes de acuerdo al riesgo en cada tarea o actividad a realizar. Se recomienda que la entrega de los EPP reutilizables y los elementos ergonómicos entregados al personal debe estar documentada (Ejemplo: Delantales de género, antiparras, guantes para baja o alta temperatura, calzado, etc.).

En general, se deben tomar las medidas de seguridad como el uso de elementos de protección personal EPP (mascarillas, delantal, etc.) para manipular los medios, en especial aquellos medios que contienen productos tóxicos, Ejemplo: compuestos como: fucsina básica y ácida, sodio selenito, etc.

Es importante señalar que los Elementos de Protección Personal (EPP) utilizados en los laboratorios, deben seleccionarse según tipo y magnitud del riesgo existente, y cumplir con las disposiciones legales establecidas en los D.S. N°18/82, N°173/82 y D.S. N°594/99 del MINSAL, debiendo contar con certificación nacional por una entidad autorizada por el ISP y, en caso de no existir una, estar inscrito en el Registro de Fabricantes e Importadores de EPP (RFI) administrado por este mismo Instituto.

El personal deberá tener capacitación en bioseguridad y biocustodia para poder desempeñar sus funciones, estas capacitaciones o inducciones deben encontrarse debidamente documentadas en la carpeta de capacitación del personal. En caso de que se requiera se deben considerar otras capacitaciones o reforzamiento cuando sea necesario.

El personal deberá planificar de manera ordenada las actividades a realizar, se recomienda diseñar flujos de un solo sentido para evitar la contaminación cruzada.

El personal del área biológica en los aspectos de higiene personal debe mantener las uñas cortas, limpias y sin esmalte. El pelo debe mantenerse corto o mantener recogido durante las actividades analíticas.

Se deberá contar en el laboratorio con un punto de seguridad para accidentes, en dicho lugar se encontrará disponible a lo menos:

- Ducha de seguridad y lavaojos.



- Botón de emergencia (alarma): La cual deberá ser activada en caso de un accidente severo, derrame mayor o incendio.



- Extintor de incendios (con mantención al día).



La ubicación del equipamiento de seguridad deberá estar debidamente señalada. El personal deberá familiarizarse en la ubicación, el manejo y uso de los equipos de seguridad del laboratorio, para utilizarlos adecuadamente en caso de emergencia.

Los reactivos deberán encontrarse debidamente rotulados y almacenados en las salas o en la bodega, espacios destinados para este fin. En caso de sustancias inflamables o corrosivas concentradas estas serán almacenadas en los gabinetes específicos. Se dispondrá de un listado de cepas y de los reactivos de riesgo disponibles en las salas y bodega, en un lugar accesible. Se debe prohibir el dejar botellas de reactivos químicos o residuos en suelo de pasillos o lugares de tránsito.

Tanto las instalaciones eléctricas como los equipos se deben mantener en condiciones óptimas, para garantizar el correcto funcionamiento y prevenir de este modo, interrupciones o daños durante las operaciones del laboratorio.

En caso de que estas tengan algún defecto deberá comunicarse a la jefatura directa a fin de que se tomen las medidas correspondientes. Se deberá colocar un letrero que indique la observación: “Fuera de Uso” o “Mal Estado” , con fecha y firma del responsable de la indicación.

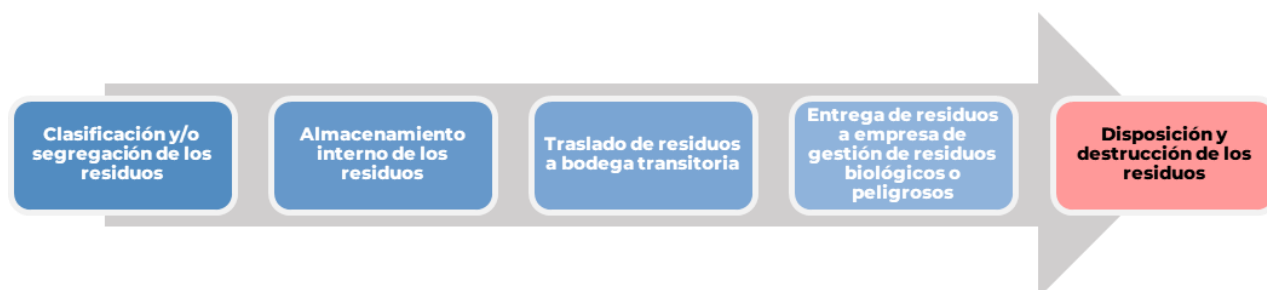
FUERA DE USO
Fecha:
Responsable:

4. FICHAS DE DATOS DE SEGURIDAD

Se contará con un archivador físico o digital en el cual se encontrarán las fichas de datos de seguridad de las sustancias o reactivos comúnmente usados o nuevos, deben estar disponibles en las salas o dependencias, en un lugar accesible. El personal deberá leer las fichas de seguridad a fin de familiarizarse con las características de las sustancias de trabajo y las debidas medidas de seguridad.

5. GESTIÓN DE RESIDUOS

Los residuos biológicos o químicos serán retirados según los protocolos establecidos a nivel por el laboratorio. Los contenedores y espacios destinados para su almacenamiento o disposición deberán encontrarse debidamente definidos y rotulados según tipo.



Esquema general de un flujo de gestión de residuos

Conforme al Decreto 6: "Reglamento sobre Manejo de Residuos de Establecimientos de Atención de Salud (REAS)" del Ministerio de Salud, en el artículo 6°; *los residuos especiales (aplica a laboratorios de microbiología) son aquellos que contienen o pueden contener agentes patógenos en concentraciones o cantidades suficientes para causar enfermedades a un huésped susceptible. En esta categoría se incluyen los siguientes: cultivos y muestras almacenadas, residuos patológicos, sangre y productos derivados, cortopunzantes y residuos de animales.*



Contenedor para eliminación de residuos biológicos en el laboratorio

El material cortopunzante y puntas de pipetas automáticas contaminados, deberán ser eliminados en cajas y desechados según los instructivos señalados anteriormente.

Se debe disponer de un procedimiento o instrucciones específicas que deben seguirse para el tratamiento de derrames (incidentes o emergencia) accidentales, de acuerdo al tipo de sustancias (químicas o biológicas) utilizadas en el Laboratorio, el personal debe ser capacitado en estas materias.



Contenedor para eliminación de vidrio roto y material cortopunzante

EQUIPAMIENTO

El laboratorio de microbiología de alimentos deberá disponer del equipamiento necesario, conforme al tipo de análisis y métodos implementados. Entre los equipos de uso más frecuente se incluyen los siguientes:

- Agitadores;
- autoclave;
- balanzas;
- baños de agua termostáticos;
- cabina de bioseguridad;
- centrifugas; congeladores;
- contadores de colonia;
- desionizador o equipo purificador de agua;
- horno de esterilización;
- Incubadoras;
- material volumétrico y aparatos de vidrio;
- micropipetas y pipetas de laboratorio;
- microscopios;
- pH-metro;
- refrigeradores;
- sistemas de filtración;
- temporizadores;
- termociclador;
- termohigrómetros;
- termómetros;
- otros equipos: medidores de pH, conductímetro, colorímetros, turbidímetros, etc.

1. HISTORIAL DE LOS EQUIPOS

Debe mantenerse un registro actualizado del equipamiento del laboratorio, el cual debe incluir, como mínimo, la siguiente información:

- Tipo de equipamiento;
- número de inventario o de identificación;
- modelo y número de serie;
- Nombre del fabricante
- lugar de instalación;
- fecha de recepción;

- fecha de puesta en marcha;
- datos respecto a servicios de mantenimiento, calibración o reparación.

El personal responsable de la operación de los equipos de laboratorio, debe estar capacitado y contar con la autorización para su uso.

Los manuales técnicos proporcionados por los fabricantes y/o proveedores deben ser considerados documentos controlados, debidamente almacenados y fácilmente accesibles para el personal autorizado. La operación de los equipos debe realizarse siguiendo estrictamente las instrucciones contenidas en dichos manuales. Adicionalmente, el laboratorio podrá desarrollar procedimientos operativos internos específicos para cada equipo, con el fin de facilitar su correcta manipulación y operación.

Es importante que la calificación de instalación de los equipos sea realizada tanto por el proveedor o por un servicio calificado y una vez finalizada la instalación, por el usuario, quien debe confirmar que el equipo ha sido recibido e instalado de manera satisfactoria.

2. MANTENIMIENTO, VERIFICACION Y CALIBRACION DE EQUIPOS

La gestión de laboratorio conforme a la ISO/IEC 17025, en el ámbito de equipamiento y metrología debe considerar al menos:

- Especificaciones del equipamiento del laboratorio.
- Calibración:
 - Determinación de intervalos de calibración;
 - interpretación de certificados de calibración.
- Verificación periódica.
- Trazabilidad metrológica.

El aseguramiento metrológico y confirmación metrológica del equipamiento es esencial. La norma ISO/IEC 17025, señala que el laboratorio debe contar con un programa de mantención, control, calibración y verificación de equipos, con una frecuencia establecida conforme a la experiencia y el análisis de riesgos en función, por ejemplo, de la necesidad, el tipo y el rendimiento del equipo. Las operaciones a realizar con los equipos pueden ser de mantenimiento preventivo y/o de calibración o verificación del adecuado funcionamiento de sus equipos. El programa de mantención y calibración de equipos tiene como objetivo garantizar el correcto funcionamiento del equipo en el tiempo.

Siempre que sea posible y apropiado, la calibración debe ser realizada por laboratorios de calibración acreditados. Las calibraciones internas son aceptables dentro de las disposiciones de las políticas del organismo de acreditación.

Antes de utilizar un equipo, se debe comprobar que sea adecuado para el propósito previsto y que cumple con los requisitos especificados antes de su uso. Además, el laboratorio se asegurará de que el equipo utilizado para las mediciones sea capaz de lograr la precisión y/o incertidumbre requeridas para producir un resultado válido.

La guía de EURACHEM del año 2023 para la acreditación de laboratorios que realizan análisis señala lo siguiente: El rendimiento o desempeño del equipo calibrado debe verificarse antes de su uso. Además de los planes de verificación programados, el equipo debe verificarse con respecto a los valores iniciales después de cada reparación o modificación significativa y, si corresponde, cambio de ubicación.



Factores que influyen en la confirmación metrológica

La confirmación metrológica del equipo de medición incluye los procesos de calibración y verificación metrológica, así como las posibles decisiones que se derivan de los resultados de la calibración (ajustes, reparaciones, etc.). La norma ISO 10012 presenta la calibración y la verificación como dos procesos secuenciales

y complementarios. La calibración determina las características metroológicas del equipo de medición, necesarias para evaluar la incertidumbre de la medida en relación con el proceso de medición. La verificación metroológica, mediante la comparación directa de la incertidumbre de la medida con los requisitos metroológicos, determinará si el equipo de medición es confirmado o no para un determinado proceso de medición.

La confirmación metroológica está sujeta principalmente a 4 factores.

Tabla 3: Factores que influyen en la confirmación metroológica

Equipo	Personal	Trazabilidad	Proceso de Medida
-Características metroológicas. -Calibración de patrones. -Requisitos del uso previsto. -Infraestructura. -Condiciones ambientales .	-Formación: conocimientos, habilidad y experiencia. -Evaluaciones periódicas.	-Calibraciones. -Verificaciones. -Patrones.	-Principio de medición. -Método de medición. -Ejecución del Procedimiento.

Las calibraciones de los equipos y aparatos deben ser realizadas por un organismo con competencia comprobable o acreditado por la norma ISO/IEC 17025 para dicho fin y alcance. La calibración de un equipo, no debe confundirse con los ajustes el usuario puede realizar, conocidos como “autocalibración” , ni tampoco con la verificación de la calibración. Las fechas de calibración, mantenimiento y la próxima calibración deben estar claramente indicadas en una etiqueta visible adherida al equipo, conforme a los requisitos del sistema de gestión de calidad.

Las verificaciones pueden ser realizadas por personal interno o externo que tenga las competencias en el procedimiento. El control interno debe ser realizado por el personal del área o por quién este asignado como responsable del equipo. Las frecuencias de las verificaciones de los equipos dependerán de diversos factores, tales como: robustez del equipo, frecuencia de uso, condiciones ambientales, resultados obtenidos de los controles, estado del equipo, recomendaciones entregadas por el fabricante, etc.

Es por ello que, los patrones o materiales de referencia utilizados por los laboratorios de ensayo deben estar debidamente calibrados o contrastados para su uso adecuado.

El material volumétrico y pipetas automáticas deben ser verificadas, normalmente esta verificación es realizada personal calificado a través de técnica gravimétrica, con la trazabilidad adecuada para el fin previsto.

Los autoclaves y hornos, utilizados en procesos de esterilización y descontaminación, deben cumplir con las tolerancias o rangos de temperatura y tiempo especificados, es decir, para los distintos ciclos y configuraciones de carga que se utilicen en el laboratorio. El laboratorio, en este sentido debe establecer cuáles son los criterios

de aceptación o rechazo de un ciclo de esterilización. La información de cada ciclo de trabajo debe estar debidamente registrada y documentada.

En el caso de la microbiología de alimentos pasa a ser muy relevante la confirmación metrológica de termómetros, equipos de incubación, balanzas, equipos de esterilización. En este sentido el “Programa de Mantenimiento, Verificación, Calibración y Control de Equipos” , debe satisfacer los requerimientos analíticos, en cuanto a su sensibilidad, exactitud y precisión.

La frecuencia de calibración y verificación del desempeño de un equipo debe establecerse en base a su historial de uso, resultados obtenidos de calibraciones o verificaciones y su comportamiento entre verificaciones (y/o calibraciones). Asimismo, se deberán tener en cuenta las recomendaciones entregadas por el fabricante u otras directrices.

Antes de utilizar las balanzas, se debe asegurar que hayan sido sometidas al control de verificación rutinario, estén con su calibración vigente y conforme. Un laboratorio de microbiología de alimentos debe estar equipado con balanzas del rango y la resolución requeridos para los diferentes elementos que se van a pesar. Para la balanza la tolerancia en pesos de masa es de $\pm 5\%$ y la tolerancia en pesos de volumen es de $\pm 2\%$, ya que se trata de una aplicación crítica que tiene un efecto directo en los resultados de los ensayos. A menos que se indique lo contrario, la resolución de la balanza debe ser lo suficientemente buena para leer al menos el 1% de la masa. Por ejemplo, para pesar 10 g, la balanza debe poder leer hasta 0,1 g; para pesar 1 g, la balanza debe poder leer hasta 0,01 g.

Es importante que el laboratorio disponga de los rangos de tolerancia y/o exactitud de los equipos de medición para establecer los límites de aceptabilidad o el rango dentro del cual aún se puede mantener la calidad.

Tabla 4: Ejemplos de rangos de mediciones de algunos equipos e instrumentos

Equipo	Rango de medición
Balanza	Resolución para leer $\geq 1\%$ de la masa.
Baño termostático para coliformes	$\pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$.
Congelador Ultra baja temperatura	$\leq -70\text{ }^{\circ}\text{C}$.
Congeladores	$\leq -18\text{ }^{\circ}\text{C}$.
Desionizador y unidades de osmosis reversa	Conductividad $\leq 25\text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$ (equivalente a una resistividad $\geq 0,04\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) y debe ser inferior a $5\text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.
Dispositivos de control de temperatura, incluidos registradores automáticos	La incertidumbre debe ser al menos cuatro veces menor que el rango de la tolerancia máxima permisible requerida.
Autoclave (esterilizador calor húmedo)	$121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
Horno (Esterilizador calor seco)	$170\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$.
GBS	Tamaño máximo partículas $0,5\text{ }\mu\text{m}$: $\leq 4000/\text{m}^3$.
Homogeneizador de paletas (peristáltico)	Rango de velocidad: 200 rpm, 230 rpm y 260 rpm. 200 rpm ofrece una mejor agitación cuando se mezclan sustancias predominantemente líquidas, permitiendo reducir el tiempo de procesado. 230 rpm se considera adecuada para la gran mayoría de las aplicaciones. 260 rpm se usa frecuentemente para preparar muestras sólidas.
Incubadoras	$\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
pH metro	$\pm 0,1$ unidad pH.
Pipetas y dispensadores	Precisión de $\pm 2\%$ para aplicaciones críticas como diluciones. Precisión de $\pm 5\%$ para aplicaciones que no tienen efecto directo en los resultados.
Sensores de temperatura	$\pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
Termómetros de columna de vidrio	$\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.
Vitrinas refrigeradas	$5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Tabla 5: Ejemplo de mantenimiento, calibración y verificación de algunos equipos críticos utilizados en laboratorios de microbiología

EQUIPO	MANTENIMIENTO	CALIBRACIÓN	VERIFICACIÓN
Autoclaves	- Realizar comprobaciones visuales de la junta, limpiar/drenar la cámara. Frecuencia: Regularmente de acuerdo a recomendaciones del fabricante. - Mantenimiento y comprobación de seguridad del recipiente a presión. Frecuencia: anual o de acuerdo a recomendaciones del fabricante. - Limpieza filtro de drenaje y limpieza interna de cámara de esterilización. Frecuencia: Semanal.	- Perfil térmico (Estudio de uniformidad y estabilidad de temperatura). Frecuencia: Al inicio antes de puesta en marcha. - Calibración de sensores de temperatura y presión. Frecuencia: Anual. Nota: Cumplir requerimientos del Reglamento de calderas, autoclaves y equipos que utilizan vapor de agua (Dto. 10/ MINSAL). Debe contar con un Operador con certificado de competencia otorgado por SEREMI de Salud.	- Control de monitor de temperatura/tiempo y ciclo de esterilización Frecuencia: En cada uso. - Control de temperatura con termómetro externo calibrado. Frecuencia: En cada uso. - Verificar eficiencia de esterilización con indicador biológico. Frecuencia: a lo menos semanal de acuerdo a ISO 17655.
Balanza	- Limpieza externa y nivelación. Frecuencia: En cada uso. - Limpieza de cámara de pesaje y ajuste de puertas. Frecuencia: En cada uso. - Servicio Técnico. Frecuencia: Anual o según necesidad.	Calibración cubriendo rango de trabajo. Frecuencia: Anual los primeros 3 años y luego disminuir la frecuencia basado en el comportamiento satisfactorio.	Verificar tara, respuesta con masa patrón y nivelación. Frecuencia: En cada uso.
Baños de agua (Baños de maría)	Limpieza y desinfección interna de superficies (no utilizar biocidas) Frecuencia: Mensual o semestral.	Perfil térmico (Estudio de uniformidad y estabilidad de temperatura). Frecuencia: Al inicio de la puesta en marcha. Después de una reparación o cambio que pueda afectar el control.	- Control de monitor de temperatura. Frecuencia: En cada uso. - Control de temperatura con termómetro externo calibrado. Frecuencia: En cada uso.
Cabinas de bioseguridad y flujos laminares	- Servicio técnico, control de sistemas mecánicos. Frecuencia: Anualmente o de acuerdo a recomendación del fabricante. - Descontaminar superficie de trabajo y superficies interiores. Frecuencia: Semanal. - Limpieza de superficies exteriores y frente. Frecuencia: Mensual. - Cambio de lámpara UV y filtro HEPA. Frecuencia: De acuerdo a necesidad, o indicaciones del fabricante.	Certificación inicial de parámetros (flujo de aire, pruebas de fugas, prueba patrón de humo, otras). Frecuencia: Al inicio de la puesta en marcha. Después de una reparación o cambio que pueda afectar el equipo. ISO 14644 señala requiere una clasificación de limpieza clase 5 (ISO 5).	- Desempeño. Frecuencia: Al inicio, anual y después de cada reparación / modificación / o cambio que pueda influir en el desempeño. - Monitoreo microbiológico. Frecuencia: En cada uso o semanal. - Monitoreo del flujo de aire. Frecuencia: En cada uso. - Control de poder germicida lámpara UV. Frecuencia: Trimestral.

EQUIPO	MANTENIMIENTO	CALIBRACIÓN	VERIFICACIÓN
Centrífugas y microcentrífugas	- Chequear que los componentes externos se encuentren libres de polvo y manchas. Limpieza exterior. Prueba con carga equiparada para evaluar nivelación. Frecuencia: Mensual. - Servicio técnico. - Frecuencia: Anual.	No requiere.	- Verifique la velocidad con un tacómetro calibrado e independiente. Frecuencia: Anual. - Control de temperatura en caso de centrífuga refrigerada mediante termómetro externo que no varíe de $\pm 3^{\circ}\text{C}$.
Congeladores	- Limpieza superficie exterior. Frecuencia: mensual - Descongelación y desinfección interna de superficies. Frecuencia: a lo menos anual. - Mantenimiento servicio técnico. - Frecuencia: Anual o según recomendaciones del fabricante.	- Perfil térmico (Estudio de uniformidad y estabilidad de temperatura). - Frecuencia: Al inicio de la puesta en marcha. Después de una reparación o cambio que pueda afectar el control.	- Control de monitor de temperatura. Frecuencia: En cada uso. - Control de temperatura con termómetro externo calibrado. - Frecuencia: En cada uso.
Contadores de colonias	- Limpieza superficie exterior. Frecuencia: Mensual. - Cambio de bombilla. Frecuencia: según necesidad. - Servicio técnico. - Frecuencia: Anual.	No requiere.	Chequear el funcionamiento manual para contar colonias. Frecuencia: Anual.
Desionizador o unidades de osmosis reversa	- Limpieza. Frecuencia: mensual. - Reemplazo de <i>cartridge</i> y filtros de membrana. Frecuencia: De acuerdo a recomendaciones del fabricante o frecuencia de uso.	No requiere.	- Control de monitor de conductividad del equipo. Frecuencia: En cada uso. - Chequear la conductividad (o resistividad) con un conductímetro independiente. Frecuencia: Semanal. - Chequear contaminación bacteriana. Frecuencia: Mensual.
Horno de esterilización	Limpieza. Frecuencia: Mensual.	Perfil térmico (Estudio de uniformidad y estabilidad de temperatura). Frecuencia: Al inicio de la puesta en marcha. Después de una reparación o cambio que pueda afectar el control de temperatura.	- Control de monitor de temperatura del equipo. Frecuencia: En cada uso. - Control de temperatura con termómetro externo calibrado. Frecuencia: En cada uso.

EQUIPO	MANTENIMIENTO	CALIBRACIÓN	VERIFICACIÓN
Incubadoras	• Limpieza y desinfección interna de superficies. Frecuencia: Mensual. • Chequear correcto cierre y buen estado de empaque de la puerta. Frecuencia: Según se requiera. • Control de microbiológico de superficie interior. Frecuencia: Mensual.	• Perfil térmico (Estudio de uniformidad y estabilidad de temperatura). • Frecuencia: Al inicio de la puesta en marcha. Después de una reparación o cambio que pueda afectar el control.	• Control de monitor de temperatura del equipo. Frecuencia: En cada uso. • Control interno de temperatura con termómetro externo calibrado sumergido en glicerol. Frecuencia: En cada uso. •
Material volumétrico de vidrio (pipetas, matraces, otros)	• Chequear por comprobación visual el estado del material de vidrio (marcas, fracturas, visibilidad de lecturas, limpieza). Frecuencia: En cada lavado. • Descontaminación, limpieza y desinfección. Frecuencia: Tras cada uso. •	• Calibración gravimétrica de acuerdo a tolerancia. Puede venir certificado de calibración de fábrica. • Frecuencia: Inicial.	• Verificación gravimétrica de cumplimiento de la tolerancia declarada del material. • Frecuencia: Anual.
Micropipetas y pipeteadores (dispensadores de volumen)	• Limpieza de sello de anillos, émbolos y paredes. lubricación del émbolo y pistón, seguir indicaciones de fabricante. Frecuencia: semestral. • Cambio de batería (si aplica). Frecuencia: según corresponda. • Esterilización en autoclave (si aplica de acuerdo a fabricante y uso). Frecuencia: Tras cada uso. •	• Calibración en 3 puntos del rango de capacidad- • Frecuencia: Anual.	• Verificar el sesgo y precisión. • Frecuencia: Regularmente, establecer de acuerdo al desempeño de las micropipetas y frecuencia de uso.
Microscopios	• Limpieza de superficie exterior, verificar ajuste de plataforma mecánica y desplazamiento, comprobar ajuste mecanismo de enfoque, verificar funcionamiento del diafragma, confirmar ajuste de uña fijaláminas y chequear nivelación. Frecuencia: Mensual. • Limpieza de lentes, objetivos, carro portamuestras y condensador. Frecuencia: En cada uso. • Cambio de bombilla. Frecuencia: Según necesidad. • Servicio técnico. Frecuencia: Anual.	• Calibración de los ejes de medida longitudinales y escala angular. Frecuencia: Al inicio de la puesta en marcha.	• Verificar alineación. Frecuencia: Anual.

EQUIPO	MANTENIMIENTO	CALIBRACIÓN	VERIFICACIÓN
Peachímetro	• Limpieza del electrodo de acuerdo a indicaciones del fabricante y comprobar buen estado. Frecuencia: En cada uso. • Cambio de solución conductora de relleno del electrodo. Frecuencia: Cuatrimestral. • Lavado con agua desionizada del electrodo y posterior almacenamiento sumergido en solución de pH 7. Frecuencia: Después de cada uso.	• Calibración con soluciones buffer trazable al SI. Frecuencia: Anual o de acuerdo a uso.	• Verificar calibración con solución buffer trazable al SI distinta a la usada en la calibración. Frecuencia: En cada uso. • Verificar pendiente y eficacia del electrodo. Frecuencia: En cada uso.
Refrigeradores	• Limpieza y desinfección interna de superficies. Frecuencia: Trimestral. • Limpieza condensador, empaque de puerta y mantenimiento por servicio técnico. Frecuencia: Anual o según recomendaciones del fabricante. • Control de microbiológico de superficie interior. Frecuencia: Mensual.	• Perfil térmico (Estudio de homogeneidad y estabilidad de temperatura). Frecuencia: Al inicio de la puesta en marcha. Después de una reparación o cambio que pueda afectar el control.	• Control de monitor de temperatura. Frecuencia: En cada uso. • Control interno de temperatura con termómetro externo calibrado sumergido en glicerol. Frecuencia: En cada uso.
Termómetros y termocuplas de trabajo	• Reemplazo de baterías. • Frecuencia: Según necesidad.	• Calibración cubriendo rango de trabajo. • Frecuencia: Anual los primeros 3 años y luego disminuir la frecuencia basada en el comportamiento satisfactorio.	• Verificar en un punto simple. Ejemplo punto de hielo (0 °C). Frecuencia: anual.
Temporizadores	• Chequear usando temporizador calibrado o contra señal horaria internacional. Frecuencia: Anual.	• No necesita.	• No necesita.
Termocicladores (PCR)	• Limpieza de pocillos Frecuencia: Tras cada uso. • Limpieza superficie exterior (carcasa) de polvos y manchas. Frecuencia: Mensual.	• Perfil térmico (Estudio de homogeneidad y estabilidad de temperatura). Frecuencia: Al inicio de la puesta en marcha.	• Control de monitor de temperatura. Frecuencia: En cada uso.
Termohigrómetro	• Reemplazo de baterías. Frecuencia: Según necesidad.	• Calibración cubriendo el rango de trabajo. Frecuencia: Anual	• Control de monitor. Frecuencia: En cada uso.

INSUMOS, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Todos los reactivos, sustancias químicas, solventes y materiales empleados en los ensayos deben cumplir con los estándares de calidad adecuados para el fin previsto.

El laboratorio debe evaluar que todos los medios de cultivo, diluyentes, sustratos, insumos y reactivos utilizados sean apropiados para los ensayos requeridos, comprobando que cumplan con los criterios o requerimientos deseados. Para ello el laboratorio debe verificar:

- Revisar los materiales existentes para detectar signos de contaminación.
- Verificar y reponer cepas de trabajo.
- Adquisición de materiales confiables.
- Revisar de manera rutinaria las fechas de vencimiento de los medios y reactivos.
- Realizar control de calidad para evaluar desempeño.

Todos los reactivos críticos adquiridos por el laboratorio deben estar acompañados de su certificado de análisis y, cuando aplique, de su hoja de datos de seguridad, ya sea en formato físico o a través de acceso digital proporcionado por el proveedor.

Las etiquetas de todos los reactivos deben especificar lo siguiente de manera clara y legible, la siguiente información:

- (a) Contenido.
- (b) Fabricante.
- (c) Fecha de recepción y fecha de apertura del envase.
- (d) Concentración o pureza (si corresponde).
- (e) Condiciones de almacenamiento.
- (f) Fecha de vencimiento o re-análisis (si es factible), según se justifique.

Por otro lado, la preparación de soluciones de reactivas y de estándares debe realizarse por personal competente y conforme a procedimientos definidos. Estas soluciones deben almacenarse en envases adecuados, especialmente si serán utilizadas posteriormente o guardadas por períodos prolongados de tiempo.

Es fundamental registrar su preparación para asegurar la trazabilidad, permitiendo identificar los reactivos o estándares utilizados en su elaboración. Además, todas las soluciones deben estar etiquetadas de forma legible y clara, incluyendo la siguiente información:

- (a) Nombre de la solución o estándar.
- (b) Fecha de preparación.
- (c) Iniciales o nombre del analista responsable de la preparación.
- (d) Concentración (si corresponde).
- (e) Condición de almacenamiento (cuando corresponda).
- (f) Fecha de vencimiento o re-análisis (si es factible), según se justifique.

Los medios de cultivo elaborados por el laboratorio, deben ser etiquetados de la siguiente manera:

- (a) Nombre del medio de cultivo.
- (b) Lote (cuando corresponda).
- (c) Fecha de preparación.
- (d) Condición de almacenamiento (cuando corresponda).
- (e) Fecha de vencimiento o re-análisis (si es factible), según se justifique.



Todos los insumos, reactivos, medios de cultivo y materiales deben mantenerse almacenados de manera segura según sus especificaciones, bajo condiciones apropiadas y temperatura controlada.

Los estantes, gabinetes o equipos de almacenamiento deben ser adecuados de acuerdo al tipo y nivel de riesgo de las sustancias.

En los casos que corresponda, ciertos materiales deberán mantenerse bajo resguardo o bajo llave en compartimientos con cierre de seguridad.

1. AGUA GRADO REACTIVO

En cuanto a la calidad del agua grado reactivo (A.G.R) utilizada en el laboratorio, esta deberá ser adecuada para los fines previstos.

Se deben establecer los requisitos de los parámetros del agua para uso en análisis microbiológico.

Para la calidad del agua para uso microbiológico, tener en cuenta, que cumpla:

- Uso de agua purificada: destilada, desionizada, desmineralizada, osmosis o sistema equivalente.
- Libre de sustancias inhibitorias o que influyan el desarrollo de los microorganismos: trazas cloro, amonio, metales, etc.
- El agua debe utilizarse tan pronto es producida.
- El agua purificada se puede almacenar en contenedores de material inerte o neutro). (deberá realizarse en dispositivos de vidrio neutro, politetrafluoretileno (PTFE) o polietileno de alta densidad polifluorinado (PHD).



La USDA plantea los siguientes requerimientos para el agua de uso en ensayos microbiológicos.

Tabla 6: Requisitos del agua grado reactivo para fines de análisis microbiológicos según USDA

Requisito	Parámetro	Frecuencia
Conductividad, $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C	$\leq 1,0$	Semanal o antes de usar
Resistencia, $\text{M}\Omega/\text{cm}$ a 25 °C	$\geq 1,0$	Semanal o antes de usar
Cloro residual total, mg/L	$\leq 0,1$	Mensual
Recuento heterotrófico en placa, ufc/mL	≤ 1000	Mensual
Metales pesados c/u (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn), mg/L	$\leq 0,05$	Anual
Metales pesados totales, mg/L	$\leq 0,1$	Anual
Toxicidad	Debe recibir resultados satisfactorios para ser considerada apta para los análisis microbiológicos	Anual

La ISO 3696:1987 "Water for analytical laboratory use — Specification and test methods" establece los requerimientos del agua para uso en laboratorio para análisis químicos inorgánicos y los métodos de control. Esta norma describe en grados 1 al 3 la calidad de agua. Para análisis de biología molecular y biotecnología se recomienda el agua Grado 1, para los análisis microbiológicos debe ser a lo menos Grado 2.

Tabla 7: Requisitos del agua grado reactivo para fines de análisis microbiológicos según ISO 3696

Requisito	Grado1	Grado 2
Conductividad, $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C	$\leq 0,1$	≤ 1
Materia Oxidable (O), mg/L	No aplica	$\leq 0,08$
Absorbancia a 254 nm y 1 cm de longitud óptica celda , en unidades de absorbancia	$\leq 0,001$	$\leq 0,01$
Residuos después de evaporación a 110 °C, mg/kg	No aplica	≤ 1
SiO ₂ , mg/L	$\leq 0,01$	$\leq 0,02$

El *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater SMEWW*, establece 3 tipos de agua grado reactivo, basado en la directriz ASTM D 1193-06:

Tabla 8: Requisitos del agua grado reactivo para fines de análisis de aguas según SMEWW 1080-C

Parámetro de calidad	Alto	Medio	Bajo
Resistividad, $\text{M}\Omega/\text{cm}$ a 25 °C	≥ 10	≥ 1	$\geq 0,1$
Conductividad, $\mu\text{Siemens}/\text{cm}$ a 25 °C	$\leq 0,1$	≤ 1	≤ 10
SiO ₂ , mg/L	$\leq 0,05$	$\leq 0,1$	≤ 1

Para fines de microbiología puede usarse clase "alto" o "medio" . Se debe asegurar un agua libre de bacterias a través de irradiación UV del agua si es factible, el uso de filtros de membrana de 0,2 μm de poro o la esterilización del agua en un frasco por calor húmedo. Las condiciones indicadas a continuación es para el agua grado reactivo para fines de análisis microbiológicos de acuerdo a SMEWW.

Tabla 9: Requisitos del agua reactivo para fines de análisis microbiológicos según SMEWW 9020: II

Parámetro de calidad	Límite máximo aceptable	Frecuencia monitoreo
Conductividad, $\mu\text{Siemens}/\text{cm}$ a 25 °C	2	Cada día de uso
Carbono orgánico total TOC, mg/L	1,0	Mensual
Metales pesados, cada uno (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn), mg/L	0,05	Anual
Metales pesados (totales), mg/L	0,1	Anual
Cloro total residual, mg/L	0,1	En cada uso o mensual
Recuento en placa de heterótrofos, UFC/mL	500	Mensual
Recuento en placa de heterótrofos, NMP/mL	500	Mensual
Test de Calidad bacteriológica*	Razón 0,8-3,0	Anual

*: ver SMEWW 9020 B. 5 *Laboratory Supplies f. Reagent –grade water 1) test for bacteriological quality*

De acuerdo a la ASTM D 1193-06, el agua para fines de análisis cualitativos y preparación de medios de cultivo debe ser tipo II. Esta directriz señala los requisitos del agua para métodos de análisis químicos y pruebas físicas. Esta recomienda que para análisis microbiológicos se recomienda el uso de agua tipo I Opción A o B.

Tabla 10: Requisitos del agua para fines de análisis microbiológicos según ASTM D 1193-06

Requisito	Tipo II	
	A	B
Resistividad, M Ω /cm	$\geq 1,0$	$\geq 1,0$
Conductividad, μ Siemens/cm a 25 °C	$\leq 1,0$	$\leq 1,0$
Carbono orgánico total, TOC, μ g/L	≤ 50	≤ 50
Sodio, μ g/L	≤ 5	≤ 5
Cloruro, μ g/L	≤ 5	≤ 5
SiO ₂ , mg/L	≤ 3	≤ 3
Recuento heterotrófico en placa, ufc/mL	≤ 1	≤ 10
Endotoxina, EU, mL	$\leq 0,03$	$\leq 0,25$

La norma chilena NCh 426/2 establece los requerimientos para el agua grado reactivo para análisis microbiológicos y preparación de medios de cultivo debe ser clase 4.

Tabla 11: Requisitos del agua para fines de análisis microbiológicos según NCh 426/2

Requisito	Límite Máximo o rango aceptable	Frecuencia
Conductividad, μ Siemens/cm a 25°C	5	Diario o antes de usar
pH a 25°C	5 - 7	Diario o antes de usar
Carbono orgánico total, TOC, mg/L *	La autoridad competente deberá establecer el límite máximo (a)	Autoridad puede establecer la frecuencia del control (b)
Cloro residual total, mg/L*	No detectado (c)	Mensual
Metales pesados c/u (Cd, Cu, Pb, Zn), mg/L*	No detectado (d)	Anual
Metales pesados c/u (Cr, Ni) mg/L	0,05	Anual
Recuento heterotrófico en placa, ufc/mL	1000	Mensual

Cuando no existe en el método o en el organismo que oficializó método pertenece, una indicación específica sobre los requerimientos del agua grado reactivo, por ser un referente nacional. Para estos parámetros con (*) recomendamos considerar las condiciones indicadas por el *Centre d' expertise en analyse environnementale du Québec*: (a) < 0,1 mg/L; (b) anual; (c) < 0,1 mg/L; (d) < 0,05 mg/L. el nivel de metales totales no debería superar 0,1 mg/L.

Para uso de autoclaves, la norma chilena NCh 426/2 establece un agua Clase 3, con el fin de proteger y evitar riesgos de funcionamiento del equipo, el agua de ingreso usada en el proceso en el equipo debe tener una conductividad menor a 10 μ Siemens/cm a 25°C y un pH entre 5-7 a 25°C. Estos parámetros deben ser controlados diariamente antes de usar.

Como se observan existen diferentes directrices que establecen requisitos específicos del agua grado reactivo que debe ser utilizada por el laboratorio, para fines de los análisis microbiológicos y la regulación chilena, recomendamos cuando es posible el uso de los lineamientos del SMEWW (Tabla 9).

El Decreto 10 “Aprueba reglamento de calderas, autoclaves y equipos que utilizan vapor de agua” del Ministerio de Salud, establece que el agua de alimentación debe ser controlada a lo menos una vez al año, o a solicitud de la autoridad sanitaria, y deberá tener:

- a) un aspecto cristalino, homogéneo y transparente,
 - b) su turbiedad no exceder las diez unidades nefelométricas (10 NTU).
- La dureza total del agua no deberá exceder de 10 partes por millón (10 ppm), expresado como CaCO_3 .
- c) El pH debe estar entre 7 y 11, a 25 °C.

2. MEMBRANAS FILTRANTES

Suficientes pruebas de desempeño se deben llevar a cabo para demostrar que el lote es apto para el propósito y que el filtro puede producir resultados consistentes para el análisis específico.

La calidad del filtro debe ser evaluada en conjunto con el medio de cultivo específico previsto para demostrar la idoneidad para su uso en una denominada prueba de **función microbiológica**. Esto implica que la prueba de la membrana debe demostrar que es apto para el sistema entero (membrana filtrante en combinación con el medio de cultivo específico y con los pasos de filtración. No se requiere evaluar la membrana individualmente).

Los resultados obtenidos para una especie o grupo de microorganismos, puede no ser válidos para otros grupos.

Tabla 12: Pasos principales para evaluación membrana filtrante

Etapa	Acción
Inóculo	Preparación de una suspensión a partir de una cepa de trabajo (80 a 120 UFC)
Ensayo	Utilizar medio de referencia y el medio de cultivo específico para evaluación productividad
Incubación	Según norma específica para recuentos (ejemplo 9308-1)
Recuento y resultado	Determinación cuantitativa de la productividad (<i>P</i>) y evaluación cualitativa selectividad y especificidad.
Liberación del lote	Liberación del lote de membrana filtrante con el lote del medio específico.

3. MATERIAL DE VIDRIO Y OTROS SUMINISTROS

Se debe verificar que el material que se utilizará en el proceso analítico se encuentre en buen estado, que cumplan con las características de resistencia, capacidad o esterilidad requeridas.

Las pipetas son dispositivos de vidrio o plástico (desechables o reutilizables) que se utilizan para administrar volúmenes de materiales líquidos o viscosos. Las pipetas automáticas (mecánicas) equipadas con puntas de plástico son dispositivos que dispensan volúmenes fijos o ajustables de líquidos.

Verificar las pipetas nuevas al recibirlas. Las pipetas reutilizables y las automáticas deben ser verificadas a intervalos regulares, según la frecuencia y la naturaleza del uso, estas deben cumplir con las especificaciones de exactitud y precisión indicada por el fabricante.

Las pipetas no desechables y las pipetas automáticas se descontaminan y esterilizan según corresponda después de cada uso. Si los cilindros o pistones de las pipetas automáticas se contaminan, de deben desmontar, limpiar y desinfectar, y posteriormente verificar.

En el caso de materiales que deban ser reutilizados los procesos de lavado y esterilización deben ser claros y estar debidamente documentados. De preferencia, en microbiología se recomienda el uso de detergentes de laboratorios neutros y libres de fosfatos, pero eventualmente se pueden utilizar detergentes de pH distinto, asegurando su debido enjuague para llegar el material a un pH neutro. En este contexto, se debe realizar el control de pH del material lavado y seco, a fin de asegurar que el pH de este se encuentre en un rango neutro entre 6,5 a 7,3 unidades de pH. Para ello, se recomienda rutinariamente realizar la prueba con azul de bromotimol 0,04 %, si se detectan residuos ácidos en viraje es amarillo, si se detectan residuos alcalinos el viraje es azul y viraje azul-verdoso rango neutro, por ello se recomienda uso de detergente alcalino para poder evidenciar la neutralidad descartando que fuese por efecto del residuo de detergente neutro.

Sin embargo, la prueba del control de lavado con el azul de bromotimol, no es suficiente para demostrar la ausencia de sustancias tóxicas, es por ello que el material de plástico o vidrio usado en microbiología y que fue sometido a procesos de lavado se debe verificar para asegurar que no presenta residuos de elementos bacteriostáticos o inhibitorios provenientes del detergente utilizado, mediante el test de residuos inhibitorios, el cual se debe realizar a lo menos una vez al año.

Se debe asegurar la limpieza o esterilidad del material de vidrio y material de laboratorio utilizado en los análisis de microbiología, hasta el momento de su uso. Para la esterilización del material en autoclave u horno, se debe considerar que este debe colocarse en recipientes especiales o envolverse con un material apropiado (papel especial, papel de aluminio, etc.), se debe indicar la fecha de caducidad de la esterilidad en cada paquete o bien

indicar la fecha de esterilización y definir por el laboratorio el tiempo de caducidad. La temperatura de esterilización de material limpio en autoclave debe ser de $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un tiempo de 15 min como mínimo, y durante al menos 30 min para material contaminado después de su uso. En horno de esterilización, como mínimo 1 h a $170\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ o equivalente.

Se debe realizar el control de esterilidad de los lotes envases o materiales estériles desechables o no, este control debe estar debidamente registrado. En general, se recomienda analizar un 2 % del lote esterilizado.

El material estéril adquirido o esterilizado por el mismo laboratorio se debe etiquetar debidamente, indicado o destacando la fecha de esterilización, fecha de caducidad, identificación de lote esterilizado, así como el responsable. Se deben tener registros de los procesos de esterilizaciones de los materiales.

4. SOLUCIONES TAMPÓN PARA MEDICIÓN DE PH

Los estándares utilizados en la calibración del medidor de pH, también denominados buffer o soluciones tampón, deben ser adecuados, en cuanto a su valor, como su trazabilidad. Al ser recepcionados se debe al igual que todo estándar registrarse su ingreso (marca, valor, lote, fecha de recepción, fecha de apertura, fecha de vencimiento, etc.) y archivar la documentación asociada a estos (certificado de análisis). Se recomienda contar con un orden establecido para su utilización, de modo que las calibraciones realizadas al peachímetro permitan puntualmente conocer que soluciones fueron utilizadas en una determinada calibración.



Soluciones para calibración de pH

Las soluciones tampón deben ser trazables al SI, los valores de pH deben estar especificados claramente con dos decimales a la temperatura de medición (ejemplo: pH 7,00 y pH 4,00 y/o pH 9,00 a 25 °C). Para el caso de la preparación de soluciones para el ajuste de pH, debe estar debidamente registrada y los reactivos utilizados deben cumplir con los criterios requeridos para ese fin.



El medidor de pH debe poder leerse hasta la unidad de pH 0,01 más cercana, lo que permite realizar mediciones con una tolerancia de $\pm 0,1$ unidad de pH y debe estar equipado con compensación de temperatura manual o automática.

Las mediciones de pH a medios de cultivo se deben realizar en una temperatura entre 20 °C a 25 °C. Medios de cultivos calientes dan lecturas de pH erróneas. Para la medición de pH de medios de cultivo se recomienda usar un electrodo plano en agares o medios sólidos.

5. MANIPULACIÓN Y PRODUCCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y OTROS PREPARADOS

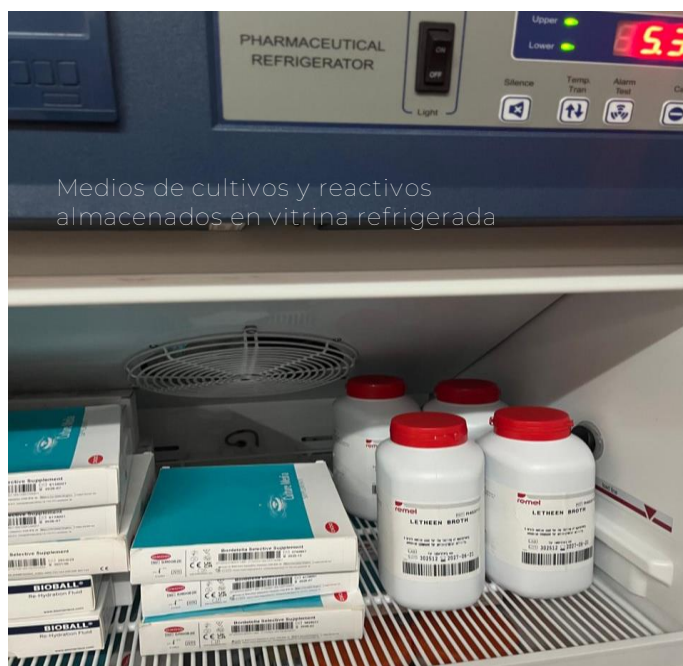
En general, el almacenaje y la manipulación de los medios de cultivos, reactivos o suplementos debe ser conforme a las indicaciones de fabricante y las directrices de seguridad siguientes:

- a) Se debe procurar que las aperturas y cierres de los frascos sean las menos posibles. Antes y después del uso, desinfectar el recipiente exterior de todos los medios y reactivos con etanol al 70 %.

- b) El tiempo durante el cual permanezca abierto el frasco que contiene el medio de cultivo debe ser el mínimo. Esto con el fin de evitar que el medio, con el tiempo se hidrate y se apelmace hasta endurecer.
- c) Se debe mantener el orden en su manipulación y almacenamiento. Se recomienda utilizar el medio de cultivo, reactivo o suplemento según un orden, por ejemplo, de acuerdo al ingreso o vencimiento, es decir, el primero que ingresa se utiliza primero, siempre que cumpla con la fecha de caducidad adecuada.
- d) Es importante, verificar que no se desprendan las etiquetas de los frascos, de lo contrario, se debe rastrear la información de los productos para etiquetar nuevamente.
- e) Los medios de cultivos deshidratados deben ser almacenados según indicaciones del fabricante. Si no dispone de la información, almacenar conforme a las recomendaciones siguientes:

Tabla 13: Recomendaciones Generales de Almacenamiento

Condiciones	Especificación
Ambientales	• En lugar seco. • Protegido de la luz y polvo. • A temperatura ambiente que no supere los 30 °C o de acuerdo a las especificaciones del fabricante, ya que hay medios deshidratados que se almacenan a temperatura de refrigeración.
Físicas	• El envase debe estar bien cerrado. • Debidamente rotulado con la información necesaria para una buena identificación. ejemplo: cuantos frascos existen de un lote y cuál de ellos se está utilizando.





- f) Los medios de cultivo, los diluyentes y los reactivos deben prepararse de acuerdo con la norma ISO 11133 o con normas específicas para el fin previsto. La norma ISO 11133 establece directrices específicas para la preparación, producción, conservación y control de calidad de los medios de cultivo, diluyentes y reactivos utilizados en microbiología y el beneficio se resumen en la tabla que se presenta a continuación. El laboratorio debe demostrar la trazabilidad en la preparación de los medios de cultivo a través del número de lote utilizado. Y debe disponer de los certificados de análisis y de calidad de los reactivos y de los medios utilizados.



Tabla 14: Ventajas de la implementación ISO 11133

Componentes	Descripción
Consistencia y Reproducibilidad	La norma asegura medios consistentes y reproducibles, lo que es crucial para la confiabilidad de los resultados analíticos
Control de Calidad	Establece las directrices para garantizar que los medios de cultivos cumplan con los estándares internacionales , lo que incluye la evaluación de rendimiento o desempeño de los medios de cultivo
Cumplimiento Normativo	Internacionalmente, es una norma obligatoria para todos los laboratorios de ensayos bajo ISO 17025 y para los medios de cultivo utilizados en el análisis de alimentos y agua. En Chile, el cuerpo de acreditación nacional no menciona explícitamente la norma ISO 11133 como un requisito obligatorio para la acreditación bajo ISO/IEC 17025, sin embargo, puede ser esencial para demostrar competencia técnica.
Estandarización	La norma presenta un diseño estandarizado para la preparación y control de calidad de los medios de cultivo, lo que reduce la variabilidad entre laboratorios y entre lotes de producción.
Producción	Establece una línea clara entre las responsabilidades de los laboratorios y los fabricantes de medios de cultivo en relación con la preparación, producción, almacenamiento y las pruebas de rendimiento.

- g) En la norma ISO 11133 se proporcionan métodos para la prueba de rendimiento de diferentes tipos de medios de cultivo y reactivos microbiológicos. Las cepas de control recomendadas para cada medio de cultivo y reactivo también se citan en la norma ISO 11133 o en normas específicas para la detección, enumeración o confirmación de microorganismos.
- h) Es posible que los medios listos para usar que hayan sido probados de acuerdo con la norma ISO 11133 por el proveedor solo necesiten pruebas reducidas por parte del laboratorio del usuario si se respetan las condiciones de transporte y almacenamiento.
- i) Dividir las soluciones estériles en alícuotas (volúmenes más pequeños) siempre que sea posible.
- j) Si no está seguro de la esterilidad de sus medios, es mejor desecharlos inmediatamente.
- k) Evitar verter líquidos estériles de un recipiente a otro, ya que esto aumenta la probabilidad de contaminación de los medios. En su lugar, utilice pipetas estériles para la transferencia aseptica de los medios.
- l) Utilizar siempre pipetas de vidrio o de plástico desechables estériles con ayuda de pipeteador para trabajar con medios líquidos. Utilice cada pipeta solo una vez para evitar la contaminación cruzada.
- m) No abrir los medios estériles, las placas de Petri o los recipientes de las pipetas hasta que estén listo para usarlos.
- n) Para los medios de cultivos esterilizados por calor húmedo (autoclave):
 - Se deben contar con autoclaves que logren ciclos de esterilización que aseguren que los medios de cultivo no hiervan (se derraman y pierden volumen) o se destaponen (pierden esterilidad).
 - Evitar el sobrecalentamiento de los medios de cultivo, ya que provocan pérdida de nutrientes. El sobrecalentamiento provoca cambios visibles en algunos casos como oscurecimiento (reacción de Maillard o pardeamiento no enzimático).
 - El ciclo más usado de esterilización es 15 minutos a $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, pero también se recomienda en algunos casos el de 10 minutos a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$. Seguir indicaciones de los proveedores de medios deshidratados y no exceder estos parámetros. Procurar que los tiempos de subida de temperatura y bajada del ciclo de esterilización sean lo más cortos posible.
 - Siempre poner cinta indicadora de autoclave en los lotes esterilizados para poder diferenciar de los lotes no estériles. En caso de lotes a esterilizar compuestos por frascos individuales, cada frasco debe tener su cinta indicadora.



- Si un medio de cultivo esterilizado requiere la incorporación de suplementos sensibles al calor, esperar que el medio se enfríe a la temperatura adecuada. Lo ideal, es contar con un baño termorregulado a una temperatura no superior a 47 °C.
- o) De preferencia se deben almacenar en un estante o bodega con topes o puertas para no sufrir derrames o roturas de frascos, ante cualquier movimiento no deseado. Ácidos y bases fuertes deben estar a ras de piso.
- p) Los medios de cultivos comerciales listos para su uso al igual que los preparados en el laboratorio, deben ser almacenados según indicaciones del fabricante. Si no dispone de la información, se sugiere almacenar conforme a las recomendaciones siguientes:
 - A temperatura de refrigeración, 2 °C a 8 °C o según indicaciones del método de ensayo u otros antecedentes técnicos.
 - No almacenar a temperaturas menor o igual a 0 °C, medios que contengan agar, porque se puede alterar la estructura del gel.
 - Protegidos de la luz.
 - Protegidos de la deshidratación en bolsas bien selladas. En caso de medios muy higroscópicos almacenar en desecador de vidrio o plástico con silica gel.



- Los medios de cultivos líquidos envasados en tubos o frascos, además, de cerrar bien sus tapas se recomienda colocarlos en una bolsa plástica.
- Seguir indicaciones dadas por la referencia metodológica de análisis si corresponde.
- Los medios sólidos que no hayan sido utilizados una vez fundidos deben ser eliminados y vueltos a almacenar.
- Los medios preparados por el laboratorio, la vigencia puede ser muy variable se recomienda no almacenar por más de 2 a 4 semanas los medios en placas y 2 a 6 meses tubos y botellas selladas. Siempre seguir las indicaciones del fabricante y de las normas específicas.
- q) Los reactivos y suplementos deben ser almacenados conforme a las indicaciones del fabricante y añadidos el día de uso.
- r) Los medios de cultivos utilizados como no utilizados (vencidos) deben ser eliminados de manera segura y siguiendo las normativas nacionales de eliminación de residuos de laboratorio.

Es importante mencionar que, la calidad de un medio de cultivo y aguas de dilución pueden verse afectada durante la preparación por factores tales como, por ejemplo; calidad del agua, masada, hidratación, ajuste de pH, dispensación, esterilización, calidad de los componentes utilizados o presentes, tiempo de preparación, etc. Estos factores a su vez implican que la preparación del medio debe estar debidamente registrada y también que se deben trabajar con equipos e instrumentos metrológicamente calibrados o verificados. Se debe tener un adecuado control de los lotes producidos y utilizados, así como registros de estos.



Los medios de cultivo, diluyentes y otras suspensiones preparadas internamente, deben ser verificadas y asegurar que tengan las características adecuadas con respecto a:

- Propiedades físicas (por ejemplo, pH, volumen y esterilidad);
- recuperación o supervivencia de los microorganismos de interés;
- inhibición o supresión de los microorganismos no deseados;
- propiedades bioquímicas (diferenciales y diagnósticas).

Conforme a lo anterior la norma ISO 11133, establece los controles de los medios de cultivo:

- a) Controles físicos (características visuales, consistencia, apariencia, etc.).
- b) pH.
- c) Evaluación de desempeño (productividad, selectividad y especificidad) de los medios.

Para realizar estos controles se debe considerar un número representativo del lote de producción, por ejemplo, el 1 %.

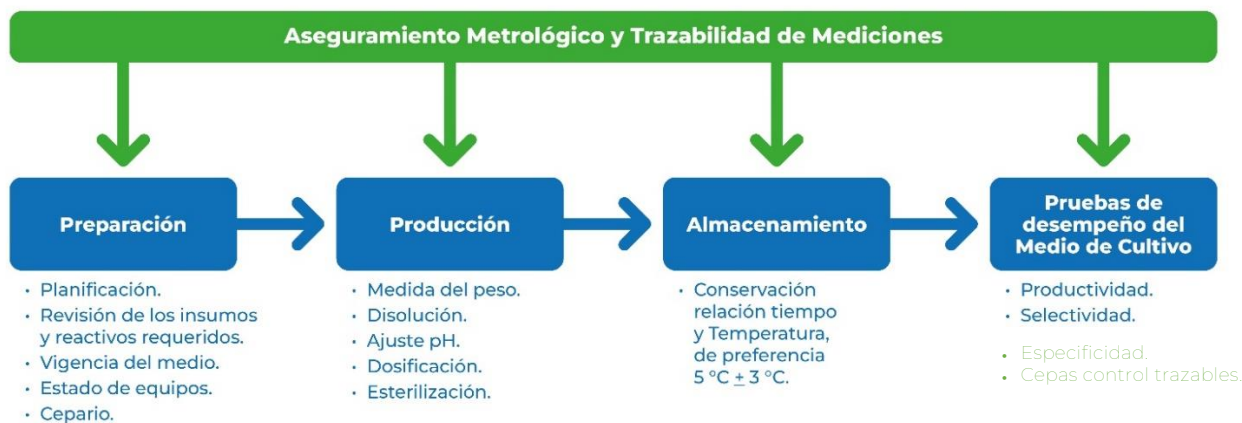
La norma ISO 11133 indica que los medios de cultivos pueden ser evaluados por métodos cualitativos o cuantitativos, tanto para medios sólidos como líquidos. Para los medios que son utilizados para la realización de recuentos, debe utilizarse métodos de ensayos cualitativos conforme al fin previsto.

Es importante mencionar respecto a la productividad de los medios de cultivo que esta se encuentra asociada a la cepa objetivo, es decir, la cepa que se desea se desarrolle robustamente en dicho medio.

En lo que se refiere a la selectividad de los mismos, esta tiene relación con la cepa no objetivo, es decir, aquella que debe ser inhibida total o parcialmente en los medios de cultivo selectivos.

La especificidad de un medio, deberá evidenciar que se mantienen las propiedades bioquímicas de las cepas en determinados medios de cultivo.

La evaluación en general de un lote de medio de cultivo debe ser aceptada cuando cumple los criterios generales y la calidad microbiológica.



Flujo de preparación de medios de cultivos de acuerdo ISO 11133

MATERIALES DE REFERENCIA Y CULTIVOS DE REFERENCIA

Un **patrón de medición**, es una magnitud materializada, un instrumento de medición, un material de referencia (MR) o un sistema de medición que están destinados a definir, realizar, conservar o reproducir tanto una unidad como uno o más valores de una magnitud de modo de transmitirlos por comparación a otros instrumentos de medición.

Conforme a la definición del Vocabulario Internacional de Metrología (VIM), el material de referencia (**MR**) es un material suficientemente homogéneo y estable respecto a propiedades especificadas, establecido como apto para su uso previsto en una medición (o en un examen de propiedades cualitativas). A su vez, define material de referencia certificado (**MRC**) como un material de referencia acompañado por la documentación emitida por un organismo autorizado, que proporciona uno o varios valores de propiedades especificadas, con incertidumbres y trazabilidades asociadas, empleando procedimientos válidos.

El uso en el laboratorio de patrones y materiales de referencia, está directamente relacionado con la calidad de los resultados analíticos. Por lo cual, el objetivo principal de su utilización es entregar una base para la obtención de medidas exactas y mediciones trazables.

Los materiales de referencia (MR) son:

- **Homogéneos:** se debe asegurar que los valores que se determinan en una muestra de un lote se puedan aplicar a cualquier otra muestra, dentro de los límites de incertidumbre indicados y,
- **Estables:** se tiene que asegurar la estabilidad en todo el periodo de validez del material. Las condiciones de conservación y de utilización deben estar bien definidas con el fin de asegurar la estabilidad.

De acuerdo con el procedimiento y dificultad de obtención, y de su calidad final, se pueden diferenciar en:

- Materiales de referencia primarios.
- Materiales de referencia secundarios.
- Materiales de referencia de trabajo o internos.

Todos los **patrones** utilizados en el laboratorio deberán estar debidamente identificados, la información de estos debe ser adecuada para su correcto uso y manipulación. Se recomienda contar con una hoja o registro en el cual

se registre los antecedentes del material y cuando corresponda su historial de calibración, verificación o uso según corresponda.

1. PATRONES Y MATERIALES DE REFERENCIA

Es importante asegurar la trazabilidad metrológica de las magnitudes que están presentes en el proceso analítico, entre las principales encontramos: temperatura y masa. En este sentido las características de los patrones de referencia o trabajo utilizados en el laboratorio deben ser adecuados para los requisitos del análisis.

En cuanto a los termómetros de vidrio o digitales su graduación en general para control de equipos de incubación normalmente no debe exceder de 0,2 °C a 0,5 °C (pueden requerirse algunos con una menor graduación por ejemplo 0,1 °C). Su estado (integridad, continuidad de la columna, etc.) debe ser verificado antes de uso por comparación con un patrón trazable al SI.

El termómetro de máxima debe tener la graduación adecuada de 0,5 °C en un rango de 80 °C a 135 °C para los requerimientos del proceso de autoclavado.

Los termómetros de trabajo deben estar debidamente verificados periódicamente contra el patrón de referencia que debe estar calibrado y trazable al SI, a fin de asegurar la trazabilidad de las mediciones de temperatura realizadas en el laboratorio. Se recomienda contar con un listado maestro de termómetros presentes en el laboratorio a fin de poder asegurar la rastreabilidad de estos, para los equipos o procesos en los cuales están asignados o son utilizados.

Las masas patrón de trabajo, deben ser del tipo adecuada (Clase OIML o ASTM) para el o los tipos de balanzas utilizadas en el laboratorio, considerando el rango de pesada y sensibilidad requerida en los procesos de pesada, y deben estar calibradas debidamente.

Los patrones y materiales de referencia (certificados o no) se deben almacenar en un lugar definido, seguro e idóneo según sus características y las recomendaciones entregadas por el fabricante (temperatura, humedad, protegido de la luz o polvo, etc.). Cuando se trabaje con materiales de referencia o patrones, se debe asegurar que su manipulación sea la apropiada de manera de evitar su alteración o contaminación. Estos deben contar con un certificado u hoja de información que permita al usuario establecer si es apropiado el uso previsto.

Se describe a continuación, brevemente, la información que en general debe incluir: Nombre y dirección del productor; Título del documento; Nombre del material; Código y número de lote del material de referencia; Descripción del material; Utilización prevista; Instrucciones para el uso correcto del material de referencia;

Situación peligrosa; Nivel de homogeneidad; Valores certificados y sus incertidumbres; Trazabilidad; Valores obtenidos por laboratorios o de métodos individuales; Valores no certificados; Fecha de la certificación; Periodo de validez; Otras informaciones; Nombres y firmas de los certificadores.

La información que se incluye en la etiqueta o marcada sobre el material o patrón de referencia debe utilizarse únicamente para identificar el material y limitarse al nombre del material y del fabricante, al código de fabricación del material, al número de lote y las advertencias en materia de seguridad y de salud o vencimiento.

Tabla 15: Recomendaciones sobre patrones físicos

Tipo de aparato	Tipo	Requisitos	Frecuencia sugerida
Pesas o masas Patrones de trabajo	Patrón de trabajo	Calibración trazable	Cada 3 años
Termómetro de máxima	Patrón de trabajo	Calibración trazable	Anualmente
Termómetro de referencia	Patrón de Referencia	Calibración trazable en rango de temperaturas de trabajo	Cada 5 años
Termocupla de referencia	Patrón de Referencia	Calibración trazable	Cada 3 años

La ISO 11133, define como cultivo de referencia a las cepas de referencia, que corresponden a cultivos conservados y distribuidos por Colecciones de Cultivo, cuyos microorganismos se encuentran definidos como mínimo a nivel de género y especie, catalogado y descrito conforme a sus características y preferiblemente procedente de alimentos, es decir; de un entorno de producción de alimentos consumo humano o animal, o de agua, según corresponda.



A partir de la cepa original del cultivo de referencia o del lote de reserva de referencia, el laboratorio prepara los cultivos de reserva, los cuales corresponden al cultivo primario derivado del cultivo de referencia o del lote de reserva de referencia. De estos cultivos de reserva se elabora el cultivo de trabajo. Estos últimos se requieren para evaluar el desempeño aceptable de los medios de cultivo (incluidos los kits de ensayos), para validar o verificar métodos, o evaluar el desempeño a través de interlaboratorios.



Se debe asegurar la trazabilidad de los cultivos de referencia, esto es esencial para evaluar correctamente el desempeño de los medios de cultivos, para realizar la validación de los métodos analíticos y para fines del control

de calidad del laboratorio. Los laboratorios deben utilizar cepas de referencia de microorganismos obtenidas de un productor comercial reconocido que sea trazable a una colección de cultivos miembro de la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC) o de la Organización Europea de Colecciones de Cultivos (ECCO).

Tabla 16: Ejemplos de materiales de referencia

Material/ Estándares	Tipo	Requisitos
Cepa de referencia	- Material de referencia (MR). - Material de referencia certificado (MRC).	- Provenir de una colección nacional o internacional reconocida. - Certificado. - Caracterización (perfil bioquímico morfológico, serología, secuenciación, pureza y viabilidad).
Material de referencia en matriz	- Material de referencia (MR). - Material de referencia certificado (MRC).	- Suficientemente homogéneo. - Estable. - Certificado u hoja de información. - Trazable.
Soluciones estándares de pH	- Material de referencia (MR). - Material control (QC).	- Certificado de análisis. - Trazable al SI.
Solución estándar de conductividad	Material de referencia (MR).	- Certificado de análisis. - Trazable al SI.
Estándar de cloro libre	Material de referencia (MR).	- Certificado de análisis. - Trazable al SI.
Estándar de metales	Material de referencia (MR).	- Certificado de análisis. - Trazable al SI.

2. CEPAS DE REFERENCIA

Para los análisis microbiológicos los materiales de referencia más utilizados son las cepas de referencia.

A diferencia del campo de la física y de la química; la biología referente a MR/MRC, presentan desafíos adicionales, teniendo en cuenta que los analitos de interés son organismos vivos y las referencias de medición deben estar orientadas a garantizar las características de la identidad del microorganismo (en el caso de ensayos cualitativos) y de cantidad o concentración (en el caso de ensayos cuantitativos).

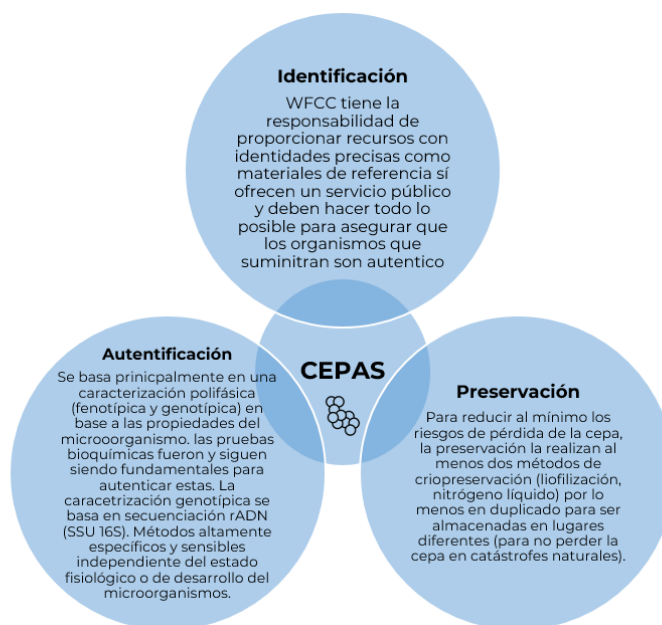
En microbiología, los materiales de referencia son las cepas o cultivos de referencia que provienen de colecciones de WFCC o de la ECCO, esto garantiza que el material de referencia esté bien caracterizado en diferentes niveles (género, especie, subespecie e incluso serotipo), catalogado y descrito acorde con sus características.

Es importante y necesario indicar que se cuenta con el *World Data Centre for Microorganisms* (WDCM), una infraestructura de información para explorar y utilizar cepas microbianas preservadas en todo el mundo.

Es así como la Iniciativa de los Centros de Recursos Biológicos (BRC) de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) recomendó que las colecciones de cultivos evolucionaran hacia estándares más elevados para los Centros de Recursos Biológicos centrándose más en las características taxonómicas y funcionales de los microorganismos para entregar información completa a los usuarios, proporcionando materiales de referencia auténticos para los científicos y a las industrias.

A través de Información sobre Colecciones de Cultivos en todo el Mundo (*Culture Collections Information Worldwide* -CCINFO), se dispone de un registro y archivo de metadatos para colecciones de cultivos de todo el mundo con identificación única al WDCM y asociada al acrónimo de la colección del cultivo proveniente (ejemplo: ATCC, NCTC, etc.) y sus equivalentes u homólogos. El sistema en línea proporciona múltiples funciones de búsqueda. Además de la búsqueda básica de nombre de especie y número de cepa, la búsqueda avanzada puede combinar múltiples campos de datos, como similitud de secuencia de genes marcadores y palabras clave en publicaciones o patentes.

La conservación de cepas es un proceso que está diseñado de modo que los organismos experimentan el número mínimo de pasajes posible, para reducir la divergencia genética de la cepa.



Colección de cepas de referencia WFCC

Existen diferentes nombres que se les asignan a las cepas de referencia, estos cultivos se denominan cepas de control, cultivos estándar, cepas de referencia, cepas de prueba y cepas de control de calidad. Estos términos generalmente se pueden usar indistintamente, aunque la preferencia es cepa de referencia o cultivo de referencia. Las cepas de referencia deben provenir de una fuente confiable. Existe consenso en que, las cepas de referencia se subcultivan para hacer cultivos madre o de reserva, que se subcultivan semanal o mensualmente para hacer los cultivos de trabajo, los que se usan a diario. Los cultivos de trabajo a menudo se mantienen como cultivos inclinados, y son estos subcultivos los que plantean las preguntas a los cuales se recomienda que no estén sobre 5 pasajes de la cepa de referencia original.

En el trabajo analítico rutinario de los laboratorios, las cepas de referencia son necesarias para demostrar que los medios de cultivo (incluidos los kits de análisis) poseen características de desempeño aceptables, para validar métodos y para control.

Como se describió al comienzo, las cepas en general deben ser:

- Microorganismos definidos en cuanto a su género y especie;
- estar debidamente caracterizados;
- de origen conocido.

Para dar cumplimiento al requisito normativo ISO/IEC 17025, el laboratorio de microbiología para demostrar su trazabilidad metrológica, debe utilizar cepas de referencia de microorganismos obtenidos directamente de una colección nacional o internacional reconocida, del más alto estándar, cuando exista alguna. Alternativamente, podrían utilizarse cepas comerciales siempre pueda demostrarse que todas las propiedades relevantes son equivalentes.

Tabla 17: Características de las cepas como Material de Referencia

Parámetro	Características
Pureza	Exento de mezcla y contaminación.
Homogeneidad	Composición y estructura uniforme respecto a uno más caracteres dentro de los límites establecidos.
Estabilidad	Mantener por un período de tiempo establecido , un valor declarado dentro de sus propiedades dentro de los límites especificados.
Trazabilidad	Cumplir con los requisitos taxonómicos definidos para la especie microbiana y sus características propias para esa cepa y los resultados de esas evaluaciones pueden ser reproducidas en otros laboratorios. Establecer la trazabilidad hacia la colección o el productor del material de referencia microbiológico.

Los laboratorios deben establecer y preservar una colección de cultivos (cepario) para el control de calidad interno. Los tres objetivos que hay que alcanzar para conservar correctamente las cepas microbianas son:

- Que el cultivo a conservar sea puro, evitando que se generen contaminaciones durante el proceso de preservación;
- que durante el tiempo de conservación sobrevivan al menos el 70 % a 80 % de las células;
- y, por último, que estas células permanezcan genéticamente estables.

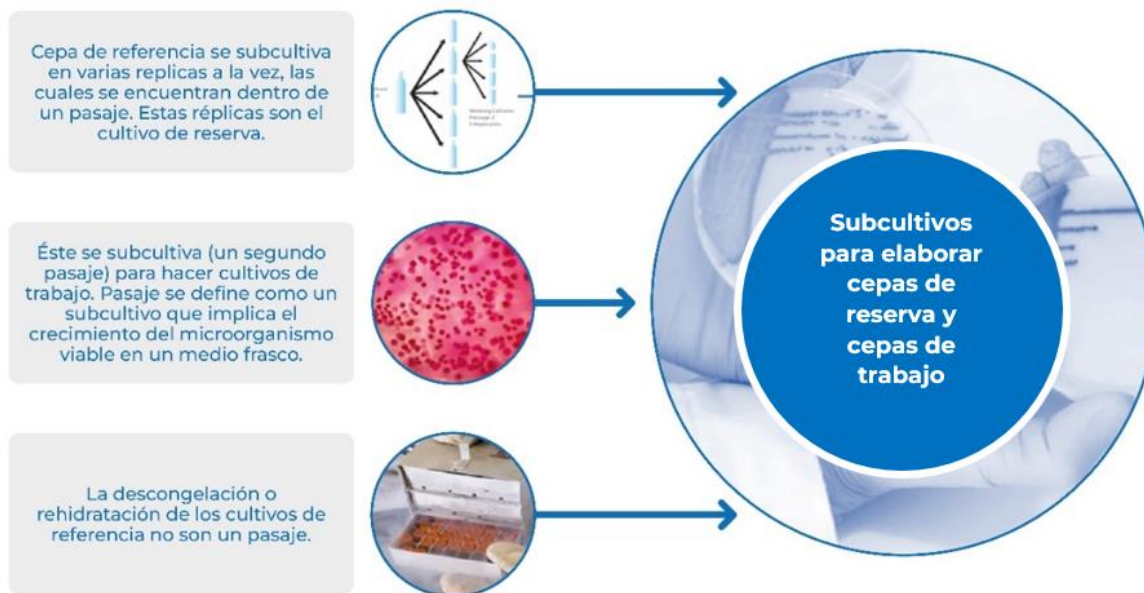
Es por ello que, durante la elaboración y mantención de un cepario debe mantenerse control de la pureza, características, bioquímicas y robustez de cada cepa con el fin de asegurar y demostrar la trazabilidad de las cepas de referencia. Además, el laboratorio deberá disponer de un procedimiento o instructivo que asegure el buen uso y manejo de estos cultivos de referencia.

Se debe verificar que las etiquetas sean legibles, se mantengan integras y están adheridas en forma segura al embalaje de cada una de las unidades de cepas de reserva de referencia, a lo largo de todo el período de validez del material.

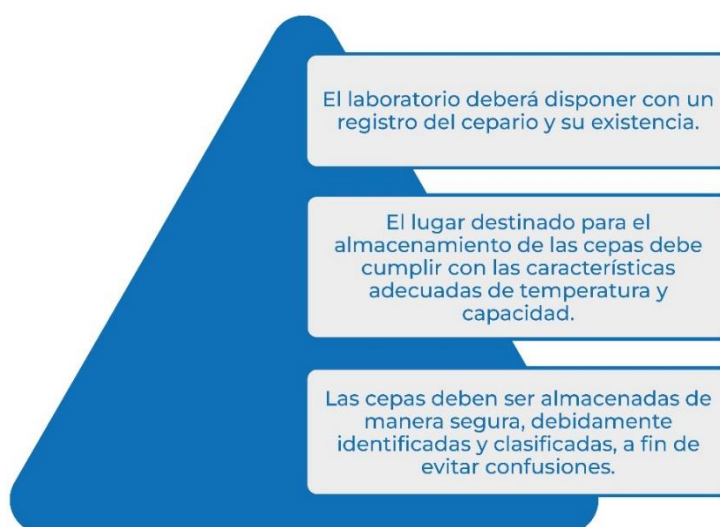
Tabla 18: Directrices generales cepas de referencia, reserva y cepas de trabajo

Cepas de referencia	Cepas de reserva	Cepas de trabajo
- Las cepas de referencia deben ser almacenadas en su envase original y deben seguir las indicaciones del fabricante sobre su cultivo y empleo	- Las cepas de referencia podrán ser subcultivadas una vez para obtener cepas de reserva, realizando en paralelo los controles de pureza y ensayos bioquímicos que sean necesarios. - Se recomienda conservar las cepas de reserva en alícuotas ultracongeladas o liofilizadas. - Si las cepas de reserva se han descongelado, no deben volver a congelarse y reutilizarse. - Los repiques a partir de una cepa de referencia deben ser limitados, esto debido a que se debe procurar evitar mutaciones, deterioros o alteraciones de las características fenotípicas y/o genotípicas de las cepas.	- No deben ser subcultivadas salvo que así se requiera y se defina en un método normalizado o que el laboratorio pueda aportar evidencias documentadas de que no se ha producido ningún cambio en ninguna propiedad importante. - No deben ser subcultivadas para sustituir las cepas de reserva. - El laboratorio debe demostrar que el número de pasajes que realiza a las cepas no afecta a sus características (en función de su uso previsto). Debe tenerse en cuenta que a mayor número de pases mayor riesgo de contaminación y de que se produzcan mutaciones.

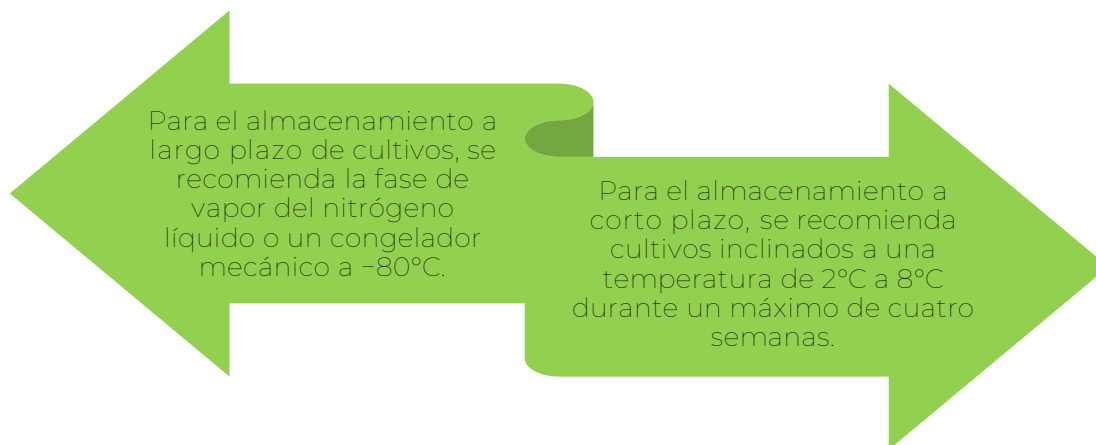
Fuente: Basado en Tesis de Marina Gascán.



Subcultivos de cepas



Condiciones de almacenamiento de cepas de referencia



Tipo de almacenamiento

Principales colecciones de cultivos microbianos Internacionales:

- ACAM: *Australian Collection of Antarctic Microorganisms*, Australia
- ATCC: *American Type Culture Collection*- Rockville, EEUU.
- BCCM: *Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organism*, Bélgica.
- CBS: *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Holanda.
- CCAP: *The Culture Collection of Algae and Protozoa*, Reino Unido.
- CCF: *Culture collection of Fungi*, República Checa.
- CCM: *Czech Collection of Microorganisms*, Republica Checa.
- CCTM: *Centre de Collection de Type Microbial*, Francia.
- CCUG: *Culture Collection*, University of Göteborg, Suecia.
- CCN: *Culture Collection Network*, EEUU.
- CIP: *Collection del Institut Pasteur*, Francia.
- DSM: *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen*, Alemania.
- ECCO: *European Culture Collection Organization*.
- IFO: *Institute for Fermentation*, Japón.
- JFCC: *Japanese Federation of Culture Collection of Microorganisms*, Japón.
- CAIM: *Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms*, Hungría.
- NCCB: *The Netherlands Culture Collection of Bacteria*, Holanda.
- NCIB Ltd.: *Bacterial Culture Collection*, Reino Unido.
- NCTC: *National Collection of Type Culture – Public Health England*, Inglaterra.
- NCYC: *National Collection of Yeast Cultures*, Reino Unido.
- NRRL: *Norwegian Radio Relay League- Culture Collection*, Noruega.
- ARS: *Agriculture Recherche Service*, EEUU.

- RIA: *Research Institute for Antibiotics*, Rusia.
- UKNCC: *United Kingdom National Culture Collections*, Reino Unido.
- VKM: *All Russian Collection of Microorganisms*, Rusia.
- WFCC: *The World Federation for Culture*.
- IEGM: *Collections Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms*, Rusia.
- WDCM: *The World Data Centre for Microorganisms*.

Tabla 19: Principales cepas de referencia utilizadas en microbiología de alimentos

Cepas recomendadas para su uso en el control de calidad	Identificador único (catálogo WDCM)
Bacterias	
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013, WDCM 00179
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	WDCM 00014
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	WDCM 00185
<i>Staphylococcus aureus</i>	WDCM 00034
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	WDCM 00036
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WDCM 00025
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087
<i>Salmonella</i> -Typhimurium	WDCM 00031
<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	WDCM 00021
<i>Listeria innocua</i>	WDCM 00017
<i>Listeria ivanovii</i>	WDCM 00018
<i>Bacillus cereus</i>	WDCM 00001
<i>Bacillus subtilis</i> subsp <i>spizizenii</i>	WDCM 00003
<i>Legionella pneumophila</i>	WDCM 00107
<i>Campylobacter jejuni</i>	WDCM 00156
<i>Campylobacter coli</i>	WDCM 00004
<i>Clostridium perfringens</i>	WDCM 00007
<i>Klebsiella aerogenes</i>	WDCM 00175
<i>Shigella sonnei</i>	WDCM 00127
<i>Proteus mirabilis</i>	WDCM 00023
<i>Citrobacter freundii</i>	WDCM 00006
<i>Cronobacter sakazakii</i>	WDCM 00214
Levaduras y Hongos	
<i>Candida albicans</i>	WDCM 00054
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	WDCM 00058
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	WDCM 00053
<i>Mucor racemosus</i>	WDCM 00181

Basado en ISO 11133:2014

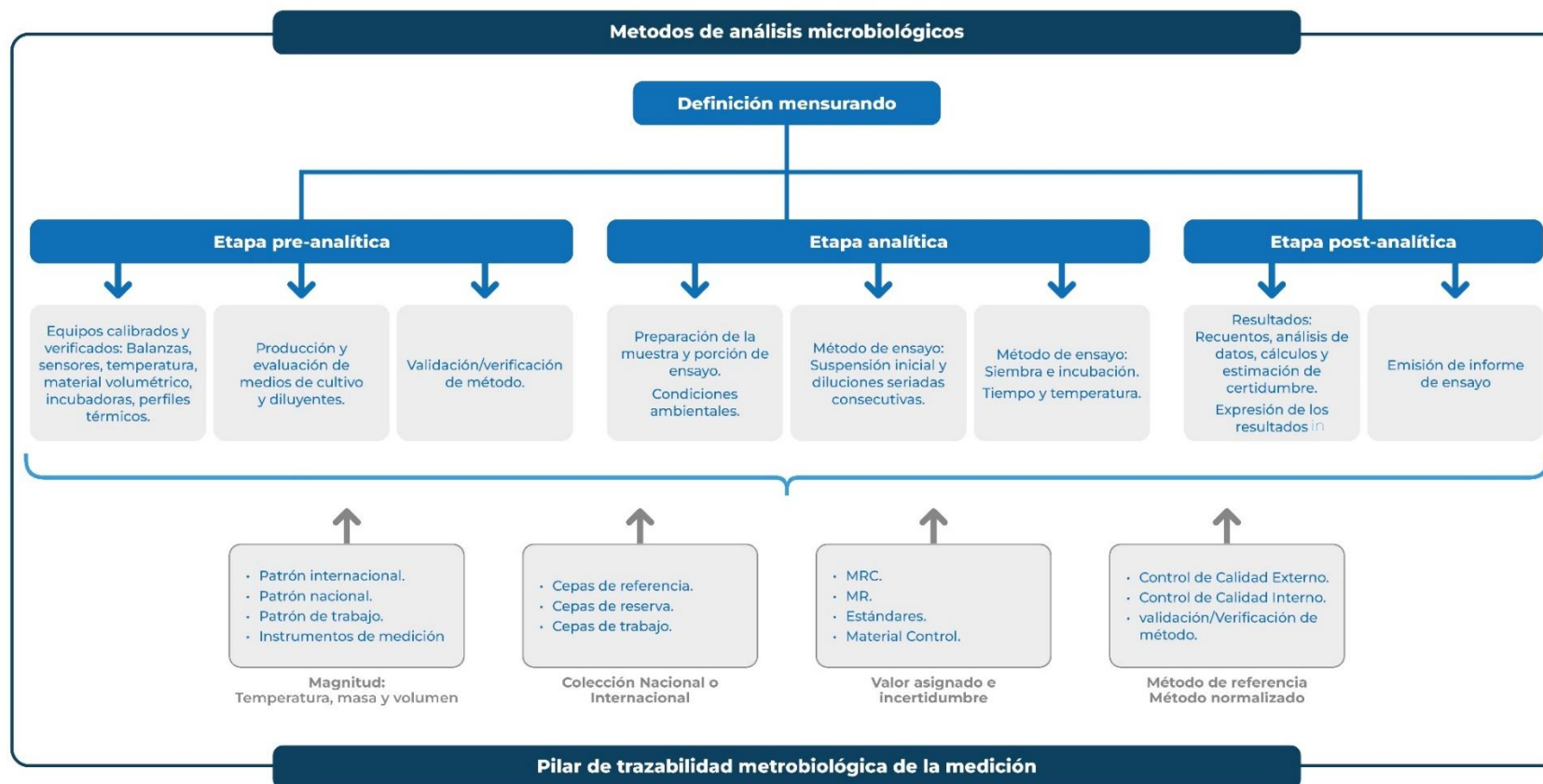
Actualmente, existen pocos materiales de referencia disponibles en el mercado, específicamente diseñados para matrices alimentarias. Estos deben cumplir con los requisitos establecidos en la norma ISO 17034.

En el caso de las mediciones microbiológicas, no es técnicamente posible establecer una trazabilidad directa al Sistema Internacional de Unidades (SI). Por esta razón, la norma ISO/IEC 17025 permite el uso de referencias apropiadas, tales como:

- Valores certificados o valores no certificados de materiales de referencia (MRC/MR), según corresponda, emitidos por productores competentes.
- Resultados obtenidos mediante procedimientos de medición de referencia.
- Métodos de referencia o normas de consenso, siempre que estén claramente descritos, sean aceptados y proporcionen resultados adecuados y confiables para el propósito previsto.

En Chile, el ISP cuenta con un Instituto Designado de Metrología que provee materiales de referencia con microorganismos en matrices alimentarias, los cuales pueden ser utilizados con este fin.

Además, es importante considerar que la trazabilidad metrológica en los laboratorios de microbiología no se limita únicamente a las mediciones biológicas. También, se asegura mediante la trazabilidad de todas las mediciones asociadas al proceso, como las realizadas con estufas, balanzas, termómetros y otros equipos, los cuales deben estar calibrados y trazables al SI.

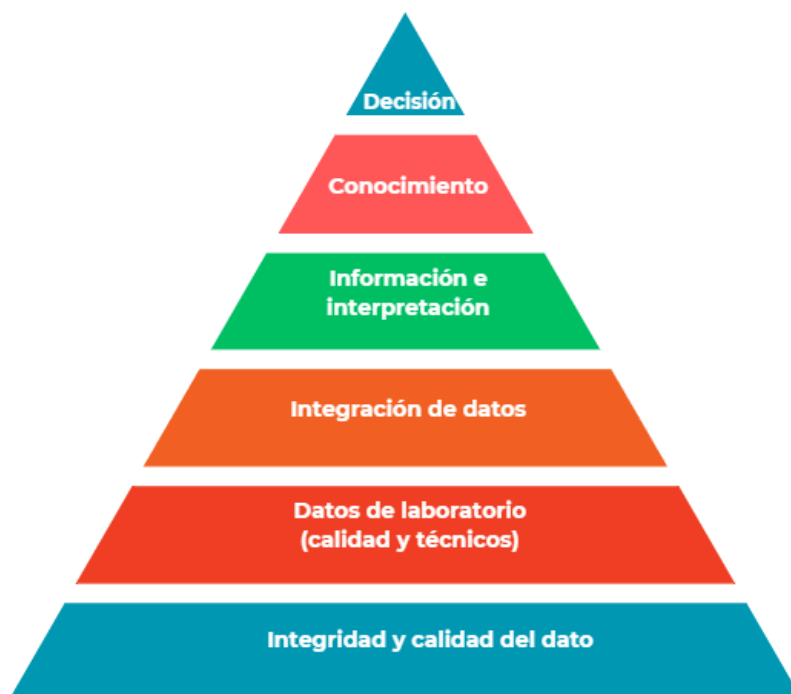


Etapas de los ensayos en microbiología de alimentos

GESTIÓN DE LA INFORMACION Y DATOS

La trazabilidad de los datos también denominada rastreabilidad de información, para no confundir con la trazabilidad metrológica, es la capacidad de identificar y reconstruir el historial completo de los datos generados en el proceso analítico, así como los cambios que sufre la información a lo largo de las diferentes etapas del proceso analítico. Esto se hace utilizando la documentación del laboratorio que debe mostrar el historial completo de los datos generados.

Los datos de los laboratorios de alimentos son estratégicos para la seguridad alimentaria, por lo cual se deben gestionar adecuadamente.



Pirámide de los datos de un Laboratorio

El registro de la información generada en el laboratorio es crucial para la rastreabilidad de los datos. En este contexto, es importante un manejo ágil de la documentación de calidad y los registros técnicos, lo que permite un correcto control de datos, para fines de su análisis como también para la detección de desvíos o errores en

ellos. Por otro lado, con el proceso de auditorías los laboratorios pueden evidenciar el cumplimiento normativo, a fin de asegurar la validez de los datos del laboratorio.

Los laboratorios generan una gran cantidad de información y su gestión mediante métodos tradicionales y manuales requiere una gran dedicación y esfuerzo. Es por ello que, actualmente la “Transformación Digital” , a través de la incorporación de tecnologías digitales en todas sus operaciones permite optimizar la gestión de los datos del laboratorio que incluye principalmente la gestión de: la planificación, gestión de documentos, programa de mantención y calibración equipos, programa aseguramiento de la calidad y validez de los resultados, gestión de muestras, análisis, inventarios e informes.

Se puede alcanzar un sistema eficiente de rastreabilidad de la información con los beneficios siguientes:

- Aumento de la eficiencia de laboratorios;
- disminuir el uso del papel;
- mejorar la disponibilidad de los registros de auditoría y rastreabilidad;
- reducción de ingreso manual de datos y de riesgo de error humano;
- integridad y seguridad de los datos;
- asegurar y facilitar accesibilidad e intercambio seguros de datos;
- depuración de flujos de trabajo y procesos;
- evidenciar de mejor manera el cumplimiento regulatorio;
- aprovechar análisis de datos para evaluar y mejorar procesos de laboratorio;
- integración con otros sistemas.

Es importante que el laboratorio, para hacer seguimiento y determinar sus propios límites de tolerancia, utilice, por ejemplo: cartas controles de los análisis realizados, sobre la evaluación de desempeño de medios de cultivo o cartas generadas por el proceso de control de equipos, las que deben estar debidamente documentadas y archivadas. Del mismo modo, aquellos documentos asociados a la confirmación metrológica de equipos o procesos de verificación, cuyo objetivo es asegurar la trazabilidad metrológica de dichas mediciones deben estar disponibles, debidamente archivadas y registradas.

Los registros en general deben contener la información necesaria para sea posible “reproducir” documentariamente la experiencia analítica. Por lo cual la rastreabilidad de los datos es fundamental.

MUESTRAS DE ENSAYO

1. MUESTREO

El muestreo independiente si es realizado por el laboratorio o por un tercero, debe estar contemplado dentro del sistema de gestión de calidad del laboratorio de acuerdo a la norma ISO/IEC 17025. Cuando el muestreo es realizado por el propio laboratorio deberá contar con personal capacitado y competente de acuerdo a una planificación definida, los procedimientos de muestreo adecuado y recursos necesarios. Del mismo modo, no se puede perder la cadena de custodia de la muestra a fin de asegurar que, desde su recolección hasta la recepción por el laboratorio, la muestra está íntegra y está identificada de manera clara e inequívoca.

En casos en que el muestreo no sea responsabilidad del laboratorio, se debe indicar claramente en el informe de ensayo. Sin embargo, el laboratorio debe proporcionar a sus clientes especificaciones técnicas sobre los criterios de la aceptación de las muestras, en cuanto a cantidad de muestra, tipo de envase, condición de almacenamiento y/o transporte, y tiempo máximo entre la toma de muestra y la recepción en el laboratorio.

Si la muestra que llega al laboratorio es recibida en condiciones inadecuadas, por ejemplo; se encuentre en condiciones de deterioro físico, cantidad insuficiente, sin cadena de frío u otras condiciones, el laboratorio debe informar al cliente antes de decidir si va analizar o rechazar la muestra, en caso de solicitar el cliente que esta se analice, en el informe se debe realizar el comentario sobre el alcance al respecto o indicar las limitaciones que estas condiciones podrían implicar en la interpretación de los resultados.

Se deben guardar los registros del muestreo, así como de las comunicaciones de los clientes.

2. MANEJO E IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se deben establecer procedimientos documentados que regulen los procesos de entrega y recepción de muestras. Cada muestra debe estar identificada de manera única e inequívoca, garantizando su trazabilidad a lo largo de todo el proceso analítico, a fin de asegurar la cadena de custodia de esta.

El laboratorio debe registrar, a lo menos:

- (a) Número unívoco de muestra.
- (b) Fecha y hora de recepción.
- (c) Condiciones de la muestra al momento de recepción, y cuando corresponda la temperatura.
- (d) Fecha y condiciones de muestreo.

Los envases y etiquetas de las muestras se deben manipular y almacenar con cuidado para evitar contaminaciones cruzadas, se recomienda desinfectar el exterior del envase sin afectar la integridad de la muestra.

El almacenamiento de las muestras en el laboratorio debe realizarse bajo condiciones apropiadas y controladas, conforme a los requisitos establecidos para cada tipo de muestra y de acuerdo a los métodos de ensayo utilizados. Las instrucciones para su manipulación y preparación previa a la realización de los análisis deben estar claramente descritas y documentada. Las muestras deben ser analizadas lo antes posible después de ser recepcionadas. De lo contrario deben ser almacenadas en condiciones apropiadas de temperatura y tiempo.

Del mismo modo, debe existir un protocolo para la retención y disposición final de las muestras o de sus excedentes, una vez concluidos los análisis. Las porciones remanentes de muestras deben ser descontaminadas antes de su eliminación o gestionadas como residuos biológicos, según corresponda, en cumplimiento con la normativa vigente.

MÉTODOS DE ENSAYOS

Es importante señalar que, el análisis celular (procariotas / eucariotas) se utiliza para evaluar y medir la cantidad de células, el estado celular, la salud y viabilidad celular, la proliferación y la toxicidad química y celular. Los ensayos basados en células, constituyen una herramienta analítica altamente informativa, cuya utilidad depende del objetivo específico del estudio, ya sea investigación básica, vigilancia sanitaria o evaluación epidemiológica. Su valor radica en que permiten observar respuestas biológicas integradas y complejas en un entorno controlado, simulando de manera más realista los procesos fisiológicos que ocurren en organismos vivos.

El análisis microbiológico, en el campo de la salud ambiental, toma una relevante importancia para los laboratorios de control, los laboratorios de fiscalización y de vigilancia sanitaria, debido a que en estos recae la entrega información que activa los sistemas de alerta temprana ante contingencias y emergencias alimentarias y medio ambientales, en base a análisis microbiológicos en alimentos y aguas. Como parte del sistema de aseguramiento de calidad de los laboratorios de análisis, estos deben participar en ensayos de aptitud tipo comparación interlaboratorios.

Para los ensayos microbiológicos de alimentos, se pueden utilizar métodos convencionales o tradicionales, métodos rápidos o alternativos. Los métodos convencionales se denominan así porque se desarrollaron hace muchos años y se han utilizado desde entonces como métodos oficiales (*gold standard*). Estos métodos se describen en las denominadas publicaciones de referencia; son aceptados internacionalmente y recomendados, por ejemplo, por la Asociación Americana de Salud Pública, la *International Commision Microbiological Foods* (ICMSF) y la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés).

El mensurando para los análisis de células (incluye procariotas) pueden agruparse típicamente en:

- Concentración de número de células (ejemplo por mL).
- Densidad superficial del número de células (ejemplo por cm^3).
- Fracción celular (ejemplo células proliferativas).
- Otras propiedades (ejemplo forma celular, actividad celular, propiedades funcionales).

El laboratorio debe generar resultados confiables para satisfacer las necesidades del cliente lo que implica que se utilicen métodos y procedimientos apropiados el microorganismo o matriz a analizar.

Se recomienda utilizar métodos normalizados, los cuales han sido debidamente validados para el propósito previsto y desarrollados conforme a normativas establecidas. Estos métodos han sido desarrollados por

organizaciones internacionales como ISO, AOAC, CEN, NMKL, AFNOR, DIN, IDF, ICMS. También algunas entidades regulatorias han publicado sus propios métodos oficiales como FDA BAM, y FSIS –USDA.

Actualmente, se encuentra disponible la serie de la norma ISO 16140 “Microbiología de la cadena alimentaria. Validación de métodos”, conformada por 6 partes, la cual está dedicada al desarrollo de protocolos de validación y verificación de métodos microbiológicos que incluyen métodos de referencia, métodos alternativos o patentados, métodos no patentados y métodos propios (*in-house*). Estas normas internacionales están diseñadas para ayudar a los laboratorios de análisis de alimentos y piensos, fabricantes de kits de análisis, autoridades competentes y operadores de empresas de alimentos y piensos que requieren implementar métodos microbiológicos.



Analista realizando recuento microbiológico

Los métodos microbiológicos en alimentos se orientan conforme a los parámetros microbiológicos donde se distinguen dos grandes grupos de microorganismos:

- Los microorganismos patógenos (incluidos los hongos): Que se refiere a un microorganismo que puede causar intoxicaciones o infecciones por causa de la ingesta de alimentos.

- Los microorganismos indicadores: Que son organismos (o sus productos metabólicos), cuya presencia en los alimentos se utiliza para evaluar el proceso de fabricación y la calidad del alimento o determinar la vida útil del mismo.

Por lo tanto, la evaluación microbiológica de la calidad e inocuidad de un alimento, es un tema clave para fines de la seguridad alimentaria.

1. TIPOS DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Por otro lado, conforme al alcance, los métodos de ensayo pueden dividirse en 3 grandes grupos: Cuantitativos, Cualitativos y de confirmación e identificación.

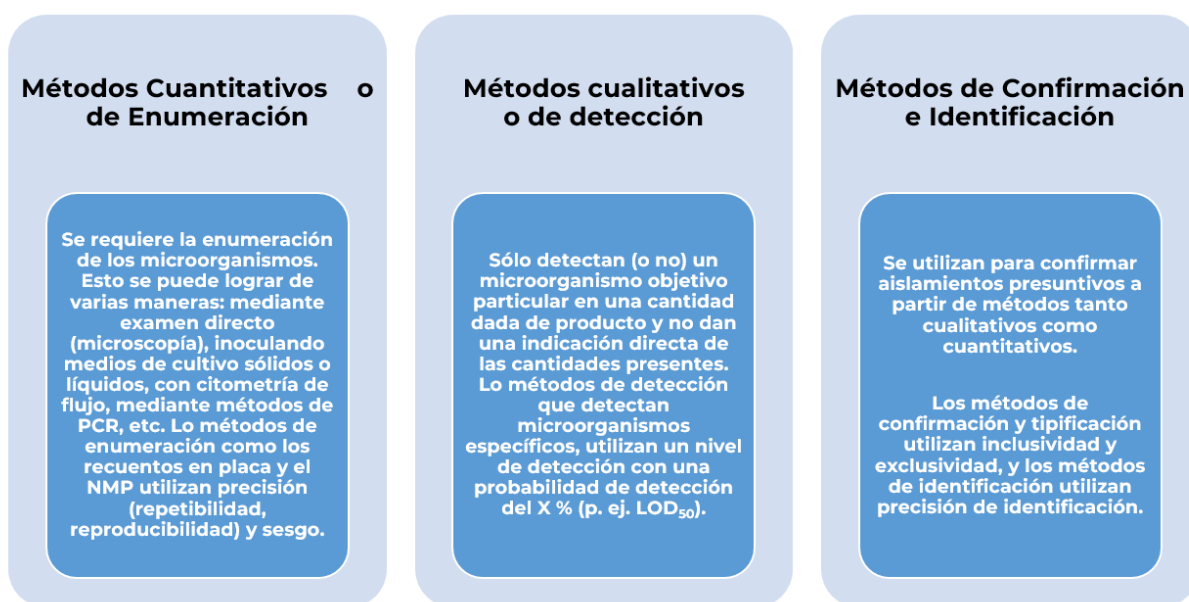


Figura 38- Tipos de métodos de ensayo microbiológicos

Los métodos de confirmación y tipificación utilizan inclusividad y exclusividad, y los métodos de identificación utilizan precisión de identificación.

Tabla 20: Clasificación general de métodos de ensayo

Método		Descripción	
Cuantitativo	Medio Sólido	Técnica Siembra en profundidad	
		Técnica siembra en superficie	Método diseminación (<i>spread</i>)
	Medio Líquido	Método convencional de número más probable (NMP)	Método placa en espiral
			Sistema dilución simple
			Sistema dilución múltiple
			Sistema dilución simétrica
			Sistema dilución Asimétrica
Cualitativo	Método Detección	Pre-enriquecimiento no selectivo o primario	Técnica de aislamiento en medios selectivos/ diferenciales
		Enriquecimiento selectivo	

ISO 7218:2024

La identificación y confirmación de las colonias presuntivas a las cuales se aplica un método para confirmar la identidad del microorganismo que generalmente es el patógeno de interés. Los métodos de confirmación pueden ir desde confirmación al nivel de familia y género, hasta métodos para confirmación/tipificación a nivel taxonómico: género, especie y de serovar(es).

Los métodos de confirmación/ identificación más utilizados son: los de identificación fenotípica o tradicional y serotipificación, los métodos genotípicos y los métodos basados en proteómica.

Tabla 21: Clasificación general de métodos para confirmación e identificación

Confirmación (proporcionan un resultado + o -)	Identificación (proporcionan la identidad)
Prueba de aglutinación en Látex	Galerías Bioquímicas
Método de hibridación ADN Amplificación molecular	Secuenciación ADN
Prueba de aglutinación en lámina	Espectrofotometría de masa

Fuente: ISO 7218:2024

La Norma Chilena NCh 2047, destaca la importancia utilizar cultivos puros para la confirmación y/o identificación de un microorganismo, para seleccionar con confianza una sola colonia y cultivarla en medio no selectivo. Para formatos de hibridación de ácidos nucleicos y amplificación molecular, el uso de cultivos mixtos puede ser aceptable si hay suficiente ADN del organismo objetivo.

2. VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE METODOS DE ENSAYOS

Tanto la validación como la verificación de los métodos microbiológicos se analizan en detalle en las normas series ISO 16140 e ISO 17468 “Microbiología de la cadena alimentaria. Requisitos técnicos y recomendaciones para el desarrollo o la revisión de métodos de referencia normalizados” . Del mismo modo está disponible la “Guía para la evaluación de métodos microbiológicos” del Instituto Nacional de Metrología de Colombia, en la cual participó entre sus autores el ISP.

La NCh 2047, señala que las características de rendimiento de los métodos de referencia estandarizados se determinan mediante estudios de validación y se han incluido en algunas normas internacionales. Estas permiten que un laboratorio usuario verifique su propio rendimiento comparando las características publicadas con sus propios resultados.

Si los métodos de referencia se sustituyen por métodos alternativos basados en principios diferentes (por ejemplo, amplificación o hibridación molecular, espectrometría de masas o secuenciación), consultar la parte correspondiente de la serie ISO 16140 para obtener detalles sobre los procedimientos de validación.

Tabla 22: Principales características de rendimiento por tipo de método

Tipo de Método	Características de rendimiento
Métodos cualitativos (detección)	Sensibilidad Nivel de detección (nivel relativo de detección) Inclusividad y exclusividad
Métodos cuantitativos (enumeración)	Veracidad relativa Perfil de precisión Inclusividad y exclusividad
Métodos de confirmación y tipificación	Inclusividad y exclusividad
Métodos de identificación	Exactitud de identificación

Fuente: ISO 7218.

La validación de los métodos microbiológicos tiene como objetivo garantizar que los ensayos de rutina cumplan con las características de desempeño establecidas del método y, por lo tanto, estén cerca del valor “verdadero” desconocido. Cabe señalar que la serie ISO 16140 cubre varios procedimientos de validación:

- Validación de métodos alternativos (propietarios o patentados) en ISO 16140-2;
- validación de un solo laboratorio para métodos desarrollados o modificados internamente en ISO 16140-4;

- validación interlaboratorio de métodos no propietarios o no patentados en ISO 16140-5;
- validación de métodos alternativos (propietarios o patentados) para procedimientos de confirmación y tipificación en ISO 16140-6.

En cambio, la verificación de método proporciona evidencia objetiva que el laboratorio es competente para realizar un método para el fin previsto, de acuerdo con las características de desempeño determinadas en el estudio de validación del mismo o las publicadas en la norma correspondiente.

Para la verificación de método consultar la ISO 16140-3, la cual contiene los protocolos para la verificación de métodos de referencia y métodos alternativos validados (propietarios o patentados) implementados en un solo laboratorio y aborda la verificación de métodos de referencia que no incluyen datos de validación.

La verificación incluye dos etapas:

- Verificación de implementación para demostrar la competencia de un laboratorio para realizar un método validado.
- Verificación de ítems (alimentos) para demostrar la competencia de un laboratorio para aplicar el método validado con las matrices analizados de forma rutinaria en el laboratorio que están incluidos en el estudio de validación.

Tabla 23: Características de desempeño del método para verificación

Método	Características de desempeño	Verificación implementación	Verificación ítem (alimento)
Cualitativo	Estimación del LOD ₅₀ (eLOD ₅₀)	Si	Si
Cuantitativo	Reproducibilidad Intralaboratorio S _{IR}	Si	No
	Estimación de bias (eBias)	No	Si

Fuente: ISO 16140-3.

El uso de microorganismos y sus derivados para los controles, se utilizan para las pruebas de rendimiento de los medios de cultivo, el control de calidad de los ensayos, la validación y verificación de métodos y las pruebas de desafío. También se utilizan para la preparación de muestras para su distribución en esquemas de pruebas de competencias.

Las actividades y mediciones realizadas durante el desarrollo del método de análisis, entiéndase: pesada de muestra, diluciones, medición de temperatura y tiempo de incubación, etc. deben estar debidamente

documentados para dar cumplimiento al requisito de la norma ISO/IEC 17025 y disponer de los controles de calidad respectivos que avalan la validez de los resultados.

Cabe señalar que, el control de calidad, dentro del “Programa de Aseguramiento de Calidad del Laboratorio” debe adaptarse a la frecuencia real de los ensayos realizados por el laboratorio. Para la interpretación diaria de los valores de control se deben aplicar reglas estadísticas.

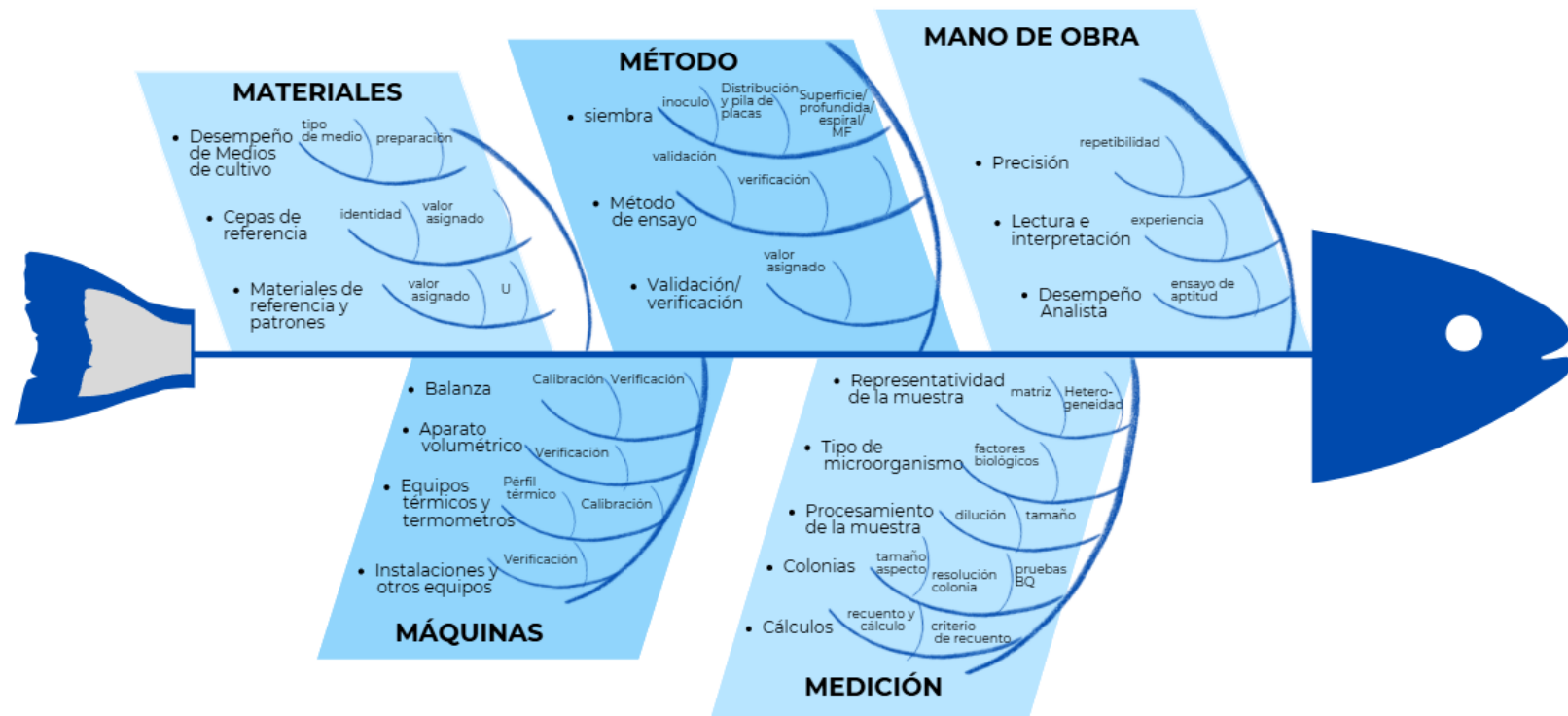
Se debe realizar un gráfico de los valores de control para ayudar en la evaluación de las tendencias de manera visual, cuando sea aplicable.

El “Programa de Aseguramiento de la Calidad del Laboratorio” se compone del control de calidad interno (CCI) y en el control externo de calidad (CCE).

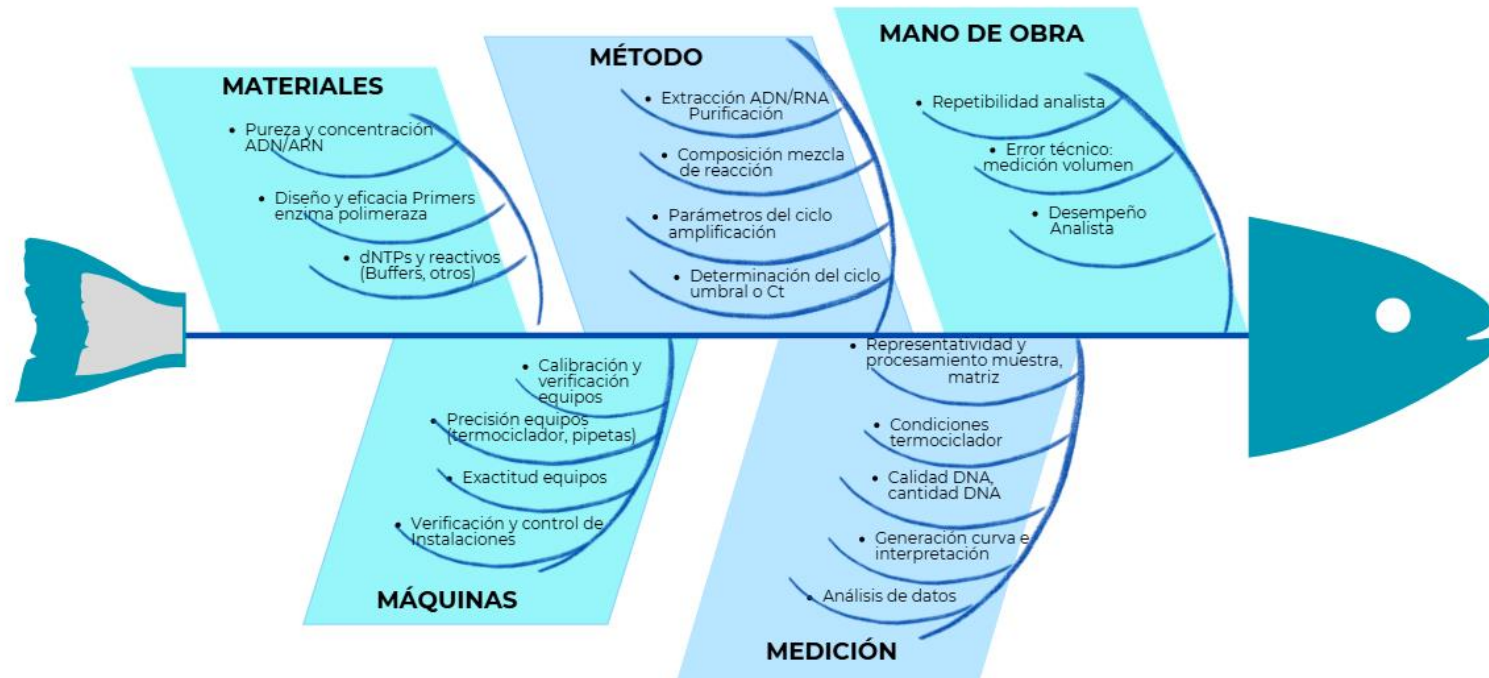
3. INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN

La norma ISO/IEC 17025 establece la importancia de estimar la incertidumbre de las mediciones en laboratorios de ensayo. EL VIM, define a la incertidumbre de una medición como el parámetro asociado al resultado, es decir, caracteriza la dispersión de los valores que razonablemente pueden ser atribuidos al mesurando, lo cual, denota la falta de exactitud (veracidad y precisión) que puede asociarse con los resultados de un análisis.

Cabe señalar que en los ensayos microbiológicos la estimación de incertidumbre no es de aplicación a métodos cualitativos, ni semicuantitativos como es el caso del número más probable (NMP). Sino a métodos de tipo cuantitativos con un modelo matemático definido, por ejemplo: $UFC = \sum_{i=0}^n x_i$, siendo x_i el número de colonias.



Fuentes de incertidumbre en mediciones microbiológicas de Recuento en placa



Fuentes de incertidumbre en mediciones microbiológicas de RT-qPCR

Puede usarse como referencia la ISO 19036 :2019 *"Microbiology of the food chain — Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations"*, norma que tiene como enfoque global o descendente para estimar la incertidumbre de la medición en microbiología de los alimentos, porque en el caso de los análisis microbiológicos, no es viable construir un modelo de medición cuantitativo exhaustivo, ya que no es posible cuantificar con precisión la contribución de cada magnitud de entrada, donde:

- El analito es un organismo vivo, cuyo estado fisiológico puede ser muy variable;
- el objetivo analítico incluye diferentes cepas, especies o géneros;
- muchas magnitudes de entrada son difíciles, si no imposibles, de cuantificar (p. ej., el estado fisiológico);
- para muchas magnitudes de entrada (p. ej., temperatura, actividad del agua), su efecto sobre el mensurando no puede describirse cuantitativamente con la precisión adecuada.

Por otro lado, para el caso de análisis microbiológico de aguas está disponible la norma ISO 29201 *"Water quelite —The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods"*.

ASEGURAMIENTO DE LA VALIDEZ DE RESULTADOS

El laboratorio debe implementar de un control de calidad que permita monitorear y verificar la validez de sus resultados de los ensayos. La aplicación de estos controles en los ensayos microbiológicos es crucial, en especial porque muchas de las mediciones obtenidas están asociados a la experiencia del analista y como al comportamiento biológico de los microorganismos vivos, lo que introduce una variabilidad inherente que debe ser gestionada adecuadamente para asegurar la confiabilidad de los resultados.

El aseguramiento de la calidad de los resultados puede ser tanto interno como externo, ambos implican un seguimiento por parte del laboratorio y deben ser registrados a fin de poder establecer acciones cuando se detecte un “fuera de control” o “no satisfactorio” . Cuando sea posible evaluar tendencias en los métodos y analistas, y de este modo establecer acciones.



Aseguramiento de la validez de los resultados de ensayo

1. CONTROL DE CALIDAD INTERNO (CCI)

El objetivo principal del Control de Calidad Interno es garantizar la confiabilidad y exactitud de los resultados durante la rutina analítica, en conformidad con criterios predefinidos.

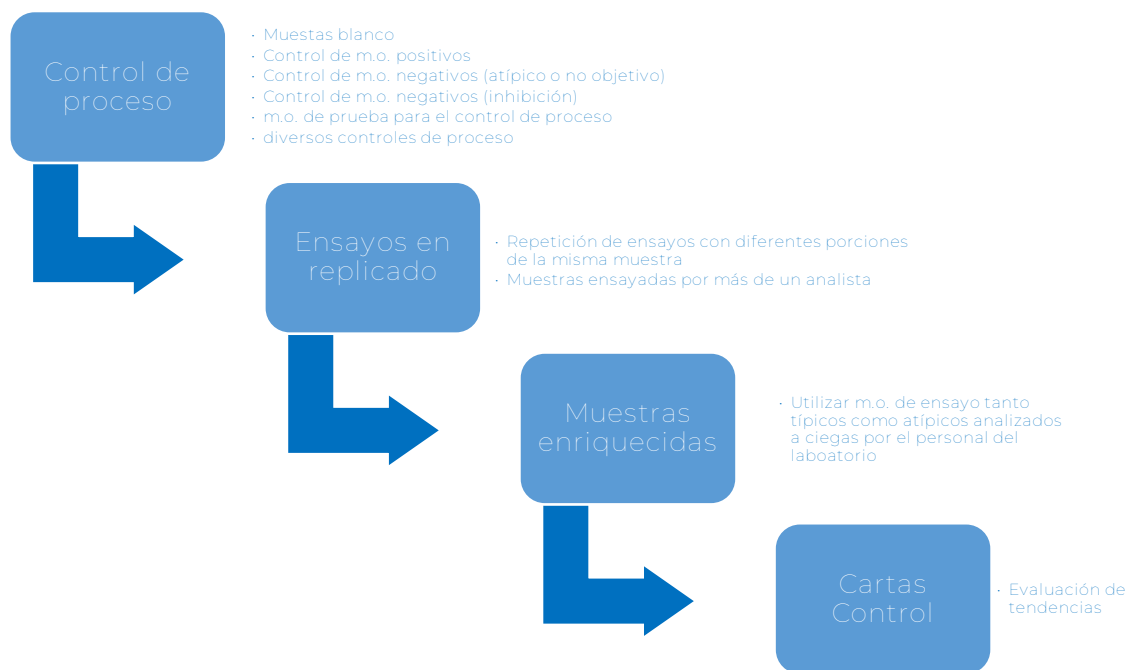
Las actividades del CCI pueden ayudar a identificar procesos técnicos que ya no están o no estaban bajo control. Las pruebas “fuera de control” deben investigarse (análisis de la causa raíz) y, de ser necesario, implementarse las medidas correctivas pertinentes.

Los controles de proceso pueden incluir blancos, controles positivos del organismo objetivo, controles negativos de un organismo no objetivo o atípico, utilizando suspensiones de cultivo o muestras enriquecidas. Estos controles realizarse en paralelo a las muestras de ensayo, con una frecuencia programada que sea definida previamente por el laboratorio.

En general, los controles de calidad pueden incluir los siguientes parámetros de procedimientos que forman parte de un programa de aseguramiento de la calidad por el laboratorio.

- a) Control de condiciones de trabajo:** Su objetivo es demostrar la capacidad de un medio de cultivo para favorecer el crecimiento bacteriano. Para esto se evalúa contra criterios de aceptabilidad pre-establecidos. Ejemplo de este tipo de controles son: verificación del factor de dilución, interlaboratorios, muestras blancas, El control de esterilidad de los medios y materiales utilizados, así como de las condiciones ambientales de la realización de los ensayos.
- b) Control de recuperación:** Este control evalúa la recuperación, esto a partir de valores de referencia. Esto puede realizarse comparando los valores obtenidos con los métodos de referencia, utilizando materiales de referencia en matriz, muestras inoculadas con cepas de referencia o muestras excedentes de ensayos de aptitud que estén vigentes.
- c) Control de Precisión:** Esta prueba está enfocada a medios que serán utilizados en ensayos cualitativos a través de muestras naturales sin inocular y/o muestras naturales inoculadas. Se pueden realizar controles paralelos al ensayo (o proceso), donde se aprovecha una o más características microbianas para diferenciar entre los microorganismos del grupo objetivo y atípicos. Estos controles se utilizan para demostrar la idoneidad del método y que el ensayo se ha realizado correctamente.
- d) Controles de veracidad (positivo/negativo):** Consiste en incluir un control positivo (cepa objetivo) posee las mismas características que el objetivo de un ensayo, mientras que el control negativo (cepa no objetivo) es uno que carece de esas características definitorias. Su inclusión en los ensayos se utiliza para confirmar la validez de los resultados del ensayo. Este control es aplicable tanto en análisis cualitativos como cuantitativos

- e) **Ensayos de desafío:** Estas pruebas se utilizan para determinar el crecimiento o la inactivación de microorganismos de interés en determinadas matrices alimentarias. La selección de cepas debe tener en cuenta las variaciones en la cinética de crecimiento o inactivación entre cepas.



Control de calidad interno en análisis microbiológicos

2. CONTROL DE CALIDAD EXTERNO (CCE)

El control de calidad externo, permite al laboratorio ser evaluado de manera imparcial en cuanto a su desempeño por un tercero, y comparar los resultados de su desempeño con otros laboratorios, lo que contribuye a detectar errores como también oportunidades de mejora.

El ISP cuenta con un programa de ensayos de aptitud en el ámbito de los alimentos, denominado Programa de Evaluación Externa de la Calidad (PEEC), dirigido a la detección de patógenos en alimentos y enumeración de microorganismos en alimentos y agua. De este modo se dispone de una herramienta metrológica a nivel nacional para poder evaluar el desempeño de los laboratorios microbiológicos del país.

De acuerdo a la ISO/IEC 17025, se puede participar en:

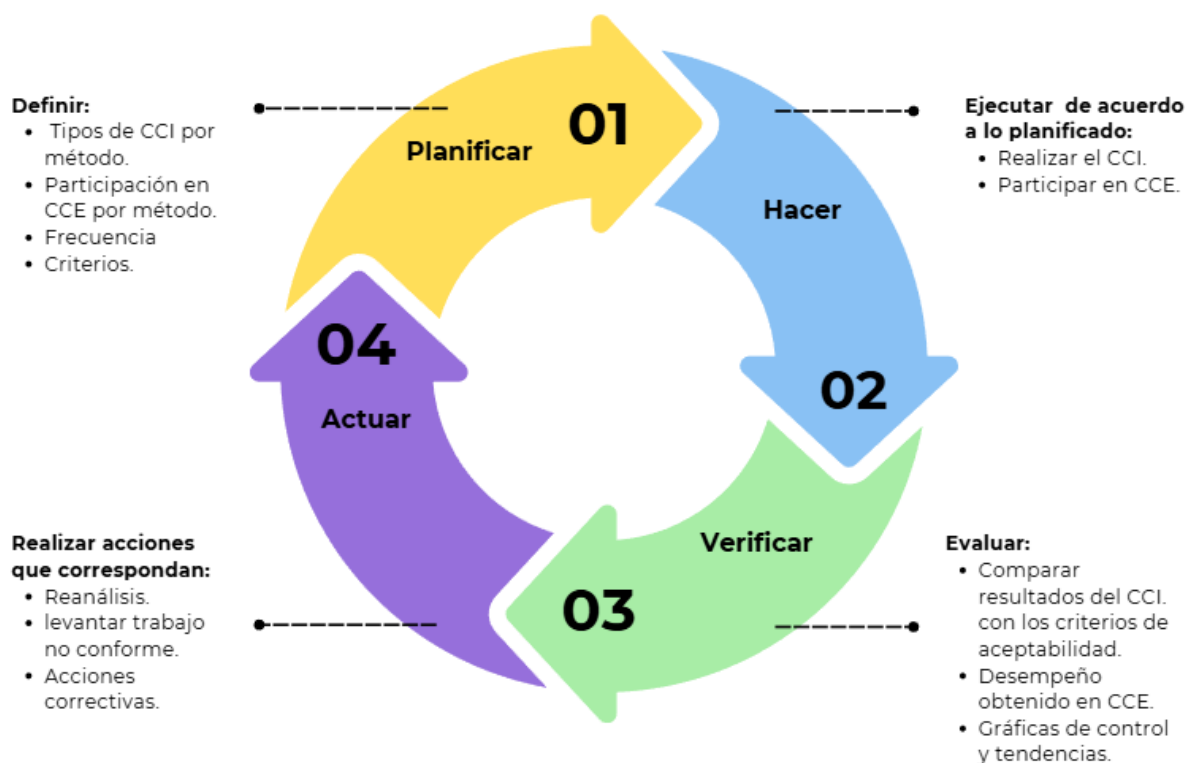
- a) **Ensayos interlaboratorios:** participar en este tipo de estudios colaborativos permite evaluar el sesgo del laboratorio y establecer las características de desempeño de un método de medición.
- b) **Ensayos de aptitud:** el objetivo principal de los ensayos de aptitud es evaluar el desempeño del laboratorio, a través de la evaluación del sesgo del laboratorio y su precisión.

CONTROLES DE CALIDAD CCI Y CCE EN EL LABORATORIO

Debe establecerse para los controles de calidad (interno y externo) la periodicidad de su aplicación, lo siguiente:

- El tipo de ensayo (cualitativo, semicuantitativo o cuantitativo).
- La robustez del método utilizado.
- La frecuencia de ejecución de los análisis.
- Los controles indicados en los métodos normalizados.
- La evaluación de los resultados históricos de las cartas de control.
- Los resultados obtenidos en el conjunto de acciones de evaluación de la calidad.
- La experiencia del personal a cargo de la realización del análisis.
- Los recursos disponibles del laboratorio.

El control de calidad externo e interno tiene un enfoque de ciclo de mejora continua. Es decir, optimizar de manera constante los procesos de los laboratorios de ensayo, basado en el ciclo PHVA (Planificar-Hacer-Verificar-Actuar), para el cumplimiento de los objetivos del laboratorio, es decir asegurar resultados válidos y confiables para la toma de decisión.



Ciclo de mejora continua (PHVA) para control de calidad de ensayos

EXPRESIÓN DE RESULTADOS E INFORMES DE ENSAYO

1. EXPRESIÓN DE RESULTADOS DE MEDICIÓN

La expresión de los resultados para las diferentes técnicas analíticas, se realiza conforme a las directrices de la ISO 7218. Los resultados de medida deben expresarse con base en un valor y unidad de medida.

Cabe destacar que en lo que refiere a análisis microbiológicos, existe una excepción respecto al uso de unidades del Sistema Internacional (SI), que se define en base a constantes universales físicas. En cambio, la UFC (unidad formadora de colonias) depende de factores biológicos como el tipo de medio de cultivo, viabilidad del microorganismo, la temperatura y el tiempo de incubación, lo que impide cumplir con los criterios de reproducibilidad y universalidad exigidos por el SI.

Por esta razón, aunque la UFC no forma parte del SI, su uso está ampliamente aceptado en el ámbito de la microbiología como una unidad práctica. Los resultados de los recuentos microbiológicos suelen expresarse en función de una fracción de masa o volumen, siendo las formas más comunes: UFC/g, UFC/mL, NMP/g ó NMP/mL, dependiendo del método de ensayo utilizado para enumeración.

Las unidades de medición deben ser expresadas, cuando sea posible de acuerdo al Sistema Internacional de Unidades, o por aquellas científicamente reconocidas internacionalmente. Las unidades frecuentemente utilizadas en el ámbito del análisis de microbiología se indican en tabla 24.

Tabla 24: Unidades de medida utilizadas en microbiología

Medición	Unidades	Símbolo
Cantidad de sustancia	mol	mol
Ciclo de cuantificación	Valor ciclo de cuantificación	Cq
Conductividad	microSiemens por centímetro	$\mu\text{S}/\text{cm}$
Conteo	Número de células	cél
Copias de genomas	Copias por microlitro Copias por gramo	copias/ μL copias/g
Cuantificación de enzimas	Unidad enzimática	U.E.
Estimación número microorganismos	Número más probable	NMP
Longitud	Ångstrom	Å
Masa	kilogramo gramo miligramo nanogramo	kg g mg ng
Molaridad	molar; mol/litro milimolar micromolar	M mM μM
Porcentaje	Por ciento	%
Presión	milímetros de mercurio Pascal Libras por pulgada cuadrada	MmHg Pa psi
Recuento colonias de microorganismos	Unidad formadora de colonia	UFC
Resistencia eléctrica	ohmio	Ω
Temperatura termodinámica	kelvin	K
Temperatura Celsius	grado Celsius	$^{\circ}\text{C}$
Tiempo	segundo minuto hora día	s min h d
Toxicológica	Unidades endotóxicas	UE
Volumen	Litro mililitro microlitro	L mL μL

Los prefijos utilizados deben estar acorde al sistema internacional de unidades.

Tabla 25: Prefijos del SI de Unidades

Múltiplo	Nombre	Símbolo	Factor de Multiplicación
10^{24}	yotta	Y	1 000 000 000 000 000 000 000 000
10^{21}	zetta	Z	1 000 000 000 000 000 000 000
10^{18}	exa	E	1 000 000 000 000 000 000
10^{15}	peta	P	1 000 000 000 000 000
10^{12}	tera	T	1 000 000 000 000
10^9	giga	G	1 000 000 000
10^6	mega	M	1 000 000
10^3	kilo	k	1 000
10^2	hecto	h	100
10^1	deca	da	10
10^{-1}	deci	d	0,1
10^{-2}	centi	c	0,01
10^{-3}	milli	m	0,001
10^{-6}	micro	μ	0,000 001
10^{-9}	nano	n	0,000 000 001
10^{-12}	pico	p	0,000 000 000 001
10^{-15}	femto	f	0,000 000 000 000 001
10^{-18}	atto	a	0,000 000 000 000 000 001
10^{-21}	zepto	z	0,000 000 000 000 000 000 001
10^{-24}	yocto	y	0,000 000 000 000 000 000 000 001

a) Resultados cuantitativos

Para métodos cuantitativos el cálculo del número final (N) de unidades formadoras de colonias por gramo o por mililitro, se expresa como UFC/g o UFC/mL, según corresponda.

El valor de la medición debería expresarse como un número comprendido entre 1,0 y 9,929 13 veces la potencia de 10 apropiada, o como un número entero con dos cifras significativas. Al hacerlo, si la tercera cifra es inferior a cinco no modifique la cifra precedente, y si la tercera cifra es mayor o igual a cinco, aumente la cifra precedente en una unidad. Ejemplo: un resultado de 15.500 UFC/g se aproxima a 16.000 UFC/g, quedando $1,6 \times 10^4$ UFC/g; si el resultado es 14.500 UFC/g se aproxima a 14.000 UFC/g quedando $1,4 \times 10^4$ UFC/g.

Se recomienda tener en cuenta las directrices establecidas en la norma ISO 7218 "Microbiología de la cadena alimentaria: requisitos generales y guía para análisis microbiológicos", la cual especifica los distintos casos posibles y los criterios aplicables para el cálculo de resultados para:

- Caso general (recuento colonias totales o típicas sin confirmación).
- Caso de recuento después de la confirmación.
- Casos espaciales:
 - No se detectan colonias;
 - más del número máximo de colonias típicas;
 - presencia de colonias presuntivas con más del número máximo de colonias tonales (típicas y atípicas);
 - límite de determinación reducido (siembra de un conjunto de placas Petri).

El resultado no deberá informarse como "cero para una unidad definida" a menos que esto sea un requisito regulatorio.

La incertidumbre de medición debe ser expresada con 2 cifras significativas en las mismas unidades o equivalentes del resultado de medida, indicando si corresponde a la incertidumbre estándar (u) o expandida (U), en este último caso, se debe señalar el factor de cobertura (k) utilizado, el cual frecuentemente es 2.

c) Resultados semicuantitativos

La NCh 2047, recomienda para la técnica del NMP utilizar una calculadora de NMP para determinar los valores de NMP a partir de la combinación de tubos positivos y negativos, frascos o pocillos de microplacas en cada dilución. El resultado (es decir, el número de tubos que producen crecimiento en cada dilución) da una estimación de la concentración inicial de bacterias en la muestra y para informar el resultado se debe indicar:

- Los criterios que distinguen los resultados positivos de los negativos varían según el microorganismo o grupo de microorganismos y se definen en las normas específicas.
- Utilizando estos criterios, contar y registrar el número de resultados positivos obtenidos con todas las porciones de ensayo derivadas de una muestra.
- Para determinar el índice o valor NMP se puede utilizar las tablas específicas del Número más probable a partir de diluciones seriadas.
- En el caso de que utilice las calculadoras, estas permiten introducir los resultados de todas las porciones analizadas, en lugar de restringir su uso a un número determinado de diluciones y réplicas, como ocurre con las tablas de NMP.
- El resultado de la calculadora debe incluir una estimación de los intervalos de confianza del 95 % para el NMP, junto con una indicación de la probabilidad de ocurrencia de la combinación de resultados que da lugar al NMP.
- Las calculadoras que cumplen estos requisitos para porciones de ensayo de 10 g y 100 g están disponibles en ISO 7218.
- La unidad del Número Más Probable se expresa comúnmente como NMP/g o NMP/100 mL (en agua).

d) Resultados cualitativos

Los métodos cualitativos sólo detectan (o no) un microorganismo objetivo concreto en una cantidad determinada de producto y no dan ninguna indicación directa de las cantidades presentes, es así como, los resultados de los ensayos cualitativos deben informarse como "Detectado/No detectado en una cantidad o volumen definido" .

2. INFORME DE ENSAYO

El informe de resultados debe cumplir con los requisitos de la ISO/IEC 17025. Debe contener a lo menos, la siguiente información, de acuerdo a la norma:

- a) Un título (por ejemplo, "Informe de ensayo");
- b) el nombre y la dirección del laboratorio;
- c) el lugar en que se realizan las actividades de laboratorio, incluso cuando se realizan en las instalaciones del cliente o en sitios alejados de las instalaciones permanentes del laboratorio, o en instalaciones temporales o móviles asociadas;
- d) una identificación única de que todos sus componentes se reconocen como una parte de un informe completo y una clara identificación del final;
- e) el nombre y la información de contacto del cliente;
- f) la identificación del método utilizado;
- g) una descripción, una identificación inequívoca y, cuando sea necesario, la condición del ítem;
- h) la fecha de recepción de los ítems de calibración o ensayo, y la fecha del muestreo, cuando esto sea crítico para la validez y aplicación de los resultados;
- i) las fechas de ejecución de la actividad del laboratorio;
- j) la fecha de emisión del informe;
- k) la referencia al plan y método de muestreo usados por el laboratorio u otros organismos, cuando sean pertinentes para la validez o aplicación de los resultados;
- l) una declaración acerca de que los resultados se relacionan solamente con los ítems sometidos a ensayo, calibración o muestreo;
- m) los resultados con las unidades de medición, cuando sea apropiado;
- n) las adiciones, desviaciones o exclusiones del método;
- o) la identificación de las personas que autorizan el informe;
- p) una identificación clara cuando los resultados provengan de proveedores externos;
- q) información sobre las condiciones ambientales del ensayo;
- r) cuando sea pertinente una declaración de conformidad, respecto de una regla de decisión debidamente documentada (por ejemplo; el Reglamento Sanitario de Alimentos);
- s) cuando sea aplicable, la incertidumbre de medición;
- t) cuando sea apropiado, opiniones o interpretaciones con una base documentada que haya sido liberada por personal autorizado por el laboratorio para ello;
- u) información adicional que pueda ser requerida por métodos específicos, autoridades o clientes.

En los casos que se realice una declaración de conformidad en base a los resultados de un ensayo, es importante tener definida la regla de decisión y el personal que realice la interpretación sea competente y esté autorizado para ello.

Los resultados de análisis microbiológicos en alimentos, tienen un impacto en determinar la inocuidad de los alimentos, y en ello su objetivo es proteger la salud de los consumidores. Es por ello que el debido aseguramiento de la calidad y validez de los resultados, permite tomar decisiones correctas que contribuyen a la seguridad alimentaria.

TERMINOLOGÍA

Agentes biológicos: Microorganismo, virus, toxina biológica, partícula o material infeccioso de otra manera, ya sea que se presente de manera natural o genéticamente modificado, que puede causar infecciones, alergias, toxicidad o crear un peligro para los seres humanos, los animales o las plantas.¹ Estos incluyen bacterias y priones. (Ref. OAS, 2023)

Alimento o producto alimenticio: Es cualquier sustancia o mezclas de sustancias destinadas al consumo humano, incluyendo las bebidas y todos los ingredientes y aditivos de dichas sustancias. (Ref. Dto. 977, RSA)

Analito: Componente representado en nombre de una cantidad medible. (Ref. ISO 16140-1, 2016). Nota 1 de entrada: En microbiología alimentaria, se refiere a un microorganismo, un grupo de microorganismos o sus productos (p. ej., toxinas) cuantificados o detectados mediante el método de análisis. Nota 2 de entrada: Los posibles objetivos de las técnicas utilizadas para la detección o enumeración del analito pueden ser ADN/ARN, proteínas, lipopolisacáridos u otros.

Áreas biolimpias: es también llamada área de contaminación controlada o zona limpia, corresponde a aquel espacio delimitado en el cual la contaminación ambiental, en términos de partículas y de microorganismos, así como la carga microbiana en las superficies (murallas, cielos, pisos y equipos) y la carga microbiana sobre el personal (máscaras, gorros, delantales, cubrecalzado, y guantes), se encuentran dentro de los límites especificados para ella (Ref. ISP-DSO, 2025).

Salas biolimpias: Sala en la que se controla y clasifica la concentración de partículas en suspensión, diseñada, construida y operada para controlar la introducción, generación y retención de partículas en su interior. (Ref. ISO 14644-1, 2015)

Zona limpia: Espacio definido en el que se controla y clasifica la concentración de partículas en suspensión, construido y operado para controlar la introducción, generación y retención de contaminantes. (Ref. ISO 14644-1, 2015)

Aseguramiento de calidad: Parte de la gestión de la calidad orientada a proporcionar confianza en que se cumplirán los requisitos de la calidad. (Ref. ISO 9000, 2015)

Aseguramiento metrológico: Conjunto de operaciones necesarias para asegurar que cumple con la capacidad de medición requerida para su correcto funcionamiento.

Biocustodia: Medidas de protección, control y responsabilidad en el laboratorio, que involucra la seguridad de personal, de documentación, información e informática, física y de movimientos y transporte, respecto de

materias relacionadas con material y muestras de agentes biológicos y/o toxinas, con el objeto de prevenir el acceso no autorizado. (Ref. Ley 21250, 2020)

Bioseguridad o seguridad biológica: Medidas de seguridad aplicadas en los laboratorios, basadas en la ejecución de los principios de contención, uso de tecnología y procedimientos destinados a prevenir la exposición no intencionada a agentes biológicos y toxinas o su liberación accidental. (Ref. Ley 21250, 2020)

Bioseguridad del laboratorio: Término empleado para englobar la combinación de prácticas, procedimientos y equipo que garantice el manejo seguro de, y la protección de los trabajadores del laboratorio, el público y el medio ambiente de la exposición involuntaria a los agentes infecciosos y toxinas utilizadas en el laboratorio. (OAS, 2023)

Calibración: Conjunto de operaciones que establecen, bajo condiciones específicas, la relación entre los valores y cantidades indicadas por el instrumento o sistema de medición, o los valores representados por un material de medición o un material de referencia, y los valores conocidos correspondientes al mensurado. (Ref. VIM, JCGM 200, 2008)

Cepa de referencia: Microorganismos definidos por lo menos al nivel de género y especie, catalogados y descritos según sus características y preferiblemente de origen conocido. Normalmente obtenidos de una colección nacional o internacional reconocida. (Ref. EURACHEM / EA Guide 04/10).

Cepa de trabajo: Subcultivo primario obtenido de una cepa de reserva. (Ref. EURACHEM / EA Guide 04/10).

Cepa microbiológica: El aislamiento de cualquier organismo microbiológico que está genotípicamente, fenotípicamente y bioquímicamente tipificado. (Ref. American Society of Microbiology).

Cepas de reserva: Cepas idénticas obtenidas mediante un único subcultivo de una cepa de referencia. (Ref. EURACHEM / EA Guide 04/10).

Criterios de aceptabilidad: Exigencias de una característica de funcionamiento en función de las cuales se puede determinar que un método analítico es adecuado para la finalidad perseguida y ofrece resultados fiables.

Elementos de protección personal (EPP): todo equipo, aparato o dispositivo especialmente proyectado y fabricado para preservar el cuerpo humano, en todo o en parte, de riesgos específicos de accidentes del trabajo o enfermedades profesionales. (Dto. 173, 1982)

Ensayo: Prueba, determinación de una o más características de un objeto de evaluación de la conformidad, de acuerdo con un procedimiento. (Ref. ISO 17000, 2020)

Equipos de seguridad: Es todo aquel aparato o dispositivo diseñado para ser utilizado en una situación de accidente o emergencia. Entiéndase: duchas de seguridad, mantas contra incendios, lavaojos, extintores.

Evaluación de Incertidumbre tipo A: Evaluación de un componente por un análisis estadístico de los valores de mediciones obtenidos en condiciones de medición definidas. Ejemplo: realizar varias mediciones en condiciones de repetibilidad. (Ref. VIM, JCGM 200,2008)

Evaluación de Incertidumbre tipo B: Evaluación de un componente de incertidumbre de la medición realizada por otros medios distinto a los del tipo A. Ejemplos: La evaluación basada en la información, obtenidos a partir de un certificado de calibración, obtenidos a partir de los límites procedentes de la experiencia del personal, otros. (Ref. VIM, JCGM 200,2008)

Idoneidad para el fin previsto: La medida en que los datos obtenidos en un proceso de medición permiten al usuario adoptar decisiones correctas, tanto desde el punto de vista técnico como administrativo, para alcanzar un fin establecido. (Ref. UNODC)

Incertidumbre: La incertidumbre de la medición es un parámetro, asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que razonablemente pueden ser atribuidos al mensurando. (Ref. VIM, JCGM 200, 2008)

Lote de medios de cultivo: Unidad homogénea y de trazabilidad completa de un medio, consistente en cuanto a tipo, calidad y que ha sido fabricado dentro de un periodo de producción definido habiéndosele asignado un número de lote. (Ref. ISO 11133, 2014)

Material de Referencia (MR): Material suficientemente homogéneo y estable en referencia a las propiedades especificadas, que ha sido establecido que es idóneo para el uso previsto en la medición o en el análisis de sus propiedades nominales. (Ref. VIM, JCGM 200,2008)

Material de Referencia Certificado (MRC): Material de referencia, acompañado de la documentación emitida por un organismo autorizado, la cual proporciona uno o más valores de la propiedad especificada con la incertidumbre y trazabilidad asociada, utilizando procedimientos válidos. (Ref. VIM, JCG 200,2008)

Matriz: Medio en el que se encuentra el analito.

Mejora continua: Actividad recurrente para aumentar la capacidad para cumplir los requisitos. (Ref. ISO 9000, 2015)

Método de ensayo validado: Método de ensayo aceptado para el que se han llevado a cabo estudios de validación con el fin de determinar su precisión y fiabilidad para un propósito específico.

Método de referencia: Método que ha sido validado como apto para su uso, contra el cual se puede comparar un método alternativo. (BPL OMS para Lab. Microbiología farmacéutica, 2011)

Metrología: Campo de los conocimientos relativos a las mediciones. También puede ser definida como “ciencia de la medición” , ya que incluye todos los aspectos teóricos y prácticos relacionados con cualquier tipo de

medición involucrada en cualquier campo científico o tecnológico. (Ref. Guía de Metrología para Pymes, RNM, división Metrología)

Muestreo: Obtención de una muestra representativa del objeto de evaluación de la conformidad, de acuerdo con un procedimiento. (Ref. ISO 17000)

Parámetro microbiológico: Los análisis microbiológicos específicos practicados a cada alimento, tales como, microorganismos indicadores, microorganismos patógenos, toxinas, etc. (Ref. RSA)

Patógeno: Un organismo que causa enfermedades. (OAS, 2023)

Patrón de medida: Realización de la definición de una magnitud dada, con un valor determinado y una incertidumbre de medida asociada, tomada como referencia. (Ref. VIM, JCG 200, 2008)

Patrón de referencia: Patrón, en general de la más alta calidad metrológica disponible en un lugar dado o en una organización determinada del cual, se derivan las mediciones realizadas en dicho lugar. (Ref. VIM, JCG 200, 2008)

Patrón de trabajo o de control: Patrón utilizado habitualmente para calibrar o verificar instrumentos o sistemas de medida. (Ref. VIM, JCG 200, 2008)

Patrón internacional de medida: Patrón de medida reconocido por los firmantes de un acuerdo internacional con la intención de ser utilizado mundialmente. (Ref. VIM, JCG 200, 2008)

Patrón Nacional de medida: Patrón reconocido por una autoridad nacional para servir, en un estado o economía, como base para la asignación de valores a otros patrones de magnitudes de la misma naturaleza. (Ref. VIM, JCG 200, 2008)

Patrón primario: Patrón establecido mediante un procedimiento de medida primario o creado como un objeto elegido por convenio. (Ref. VIM, JCG 200, 2008)

Patrón secundario: Patrón establecido por medio de una calibración respecto a un patrón primario de una magnitud de la misma naturaleza. (Ref. VIM, JCG 200, 2008)

Patrón viajero: Patrón, en ocasiones de construcción especial, destinado para ser transportado a diferentes lugares. (Ref. VIM, JCGM 200, 2008)

Plan de muestreo: El procedimiento en que se estipula el tamaño de la muestra (n), y el criterio de aceptación o rechazo (c), de forma que pueda tomarse una decisión respecto a si se debe aceptar o rechazar el alimento inspeccionado, basándose en los resultados del análisis (Ref. DTO. 977, RSA)

Precisión: Proximidad entre las indicaciones o los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, o de objetos similares, bajo condiciones especificadas. (Ref. VIM, JCG 200, 2008). También es

definida como: Es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos de mediciones repetidas. Estipuladas (Ref. ISO 5725-1, 2023)

Procedimiento: Forma especificada para llevar a cabo una actividad o un proceso. (Ref. ISO 9000, 2015)

Proceso de medición: Conjunto de operaciones que permiten determinar el valor de una magnitud. (Ref. ISO 9000)

Repetibilidad: Grado de concordancia entre los resultados de sucesivas mediciones del mismo mesurando realizadas en las mismas condiciones de medición. (Ref. VIM, JCG 200, 2008)

Reproducibilidad: Grado de concordancia entre los resultados de mediciones del mismo mesurando realizadas en diferentes condiciones de medición. (Ref. VIM, JCG 200, 2008)

Trazabilidad de datos (rastreadabilidad): El historial (traza) del elemento en cuestión. Es decir, es la capacidad de seguir el rastro de los datos desde su punto de origen hasta su destino final, registrando cada etapa intermedia de su recorrido. Es el seguimiento que permite saber de dónde provienen, cómo se transforman, cómo se utilizan y quién tiene acceso a ellos; lo que posibilita la transparencia de los datos y garantiza la calidad, la seguridad y el cumplimiento normativo.

Trazabilidad Metrológica: Propiedad del resultado de una medición –o el valor de un estándar que consiste en que se puede establecer el resultado previsible de su comparación directa con los patrones apropiados, generalmente nacionales o internacionales, mediante una cadena ininterrumpida de comparaciones reales, todas con incertidumbres conocidas. (Ref. VIM, JCG 200, 2008)

Validación: Verificación en la que los requisitos especificados son idóneo para un uso previsto. (Ref. VIM, JCG 200, 2008)

Validación de método: Establecimiento de las características de rendimiento de un método y provisión de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos de rendimiento para un uso previsto específico. (Ref. ISO 16140-1, 2016)

Verificación: Confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos especificados. (Ref. ISO 9000, 2015)

Verificación de método: Demostración de que un método validado funciona en manos del usuario según las especificaciones del método determinadas en el estudio de validación y es adecuado para su propósito. (Ref. ISO 16140-1, 2016)

BIBLIOGRAFÍA

1. ASTM. ASTM D1193-06. *Standard Specification for Reagent Water*. www.astm.org
2. ATCC [Internet]. 2022 [citado 11 de diciembre de 2025]. Reference Strains: How Many Passages are Too Many? Disponible en: <https://www.atcc.org/resources/technical-documents/reference-strains-how-many-passages-are-too-many>
3. ATCC. Bacteriology Culture Guide [Internet]. Virginia: American Type Culture Collection; 2025 [citado 11 de diciembre de 2025] p. 28. Report No.: BCG-042025-v10. Disponible en: <https://www.atcc.org/-/media/resources/culture-guides/bacterial-culture-guide.pdf?rev=5a7bbd74b12543c4b0960385cc7e8d5b&hash=3C71F5F34FBB3D68C1520ACF61092F6D>
4. AWWA WA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th Edition. Washington; 2023. 1516 p.
5. Binder M, Williams A, Sin S. Biosecurity in the Americas: A Regional Threat Assessment. [Internet]. Washington: UNSCR 1540 Implementation Program of the Inter-American Committee against Terrorism, Organization of American States; 2023 [citado 11 de diciembre de 2025]. 54 p. Disponible en: <https://www.oas.org/es/sms/cicte/docs/Bio/Biocustodia%20en%20las%20Am%C3%A9ricas.%20Evaluar%20la%20seguridad%20regional%20de%20amenazas.pdf>
6. Bureau International des Poids et Mesures. BIPM. [citado 11 de diciembre de 2025]. BIMP. Disponible en: <https://www.bipm.org/en/>
7. CEA-ENAC - 20 Criterios Específicos de Acreditación. Análisis microbiológico. Serie 1-2023
8. Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. Programme d'accréditation des laboratoires d'analyse: Programme d'accréditation Des laboratoires d'analyse [Internet]. Québec: Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques; 2018 [citado 11 de diciembre de 2025]. 38 p. Disponible en: https://www.ceaeq.gouv.qc.ca/accreditation/pala/dr12sca02_lignes_dir_micro.pdf
9. Code of Federal Regulations: A point in time eCFR system [Internet]. 2025 [citado 11 de diciembre de 2025]. 21 CFR Part 58: Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies. Disponible en: <https://www.ecfr.gov/current/title-21/part-58>
10. Codex Alimentarius. Manual de Procedimiento de la Comisión del *Codex Alimentarius*- 30º Edición-OMS/FAO.

11. Criterios Específicos de Acreditación: Análisis microbiológico [Internet]. ENAC; 2023 [citado 11 de diciembre de 2025] p. 9. (Serie 1). Report No.: CEA-ENAC-20 Rev. 2. Disponible en: <https://www.enac.es/documents/7020/5bdcf1e4-5598-4194-a076-125690f60654>
12. EURACHEM, *Accreditation for Microbiological Laboratories*, 3° Ed 2023.
13. FAO, WHO. Codex alimentarius commission: Procedural Manual [Internet]. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2025 [citado 11 de diciembre de 2025]. 216 p. Disponible en: <https://openknowledge.fao.org/bitstreams/259712c2-744d-497b-8219-28c49471d71f/download>
14. FDA, HHS. Part 58- *Good Laboratory Practice for nonclinical Laboratory studies*. Food Safety Assessment: Overview of Metrological Issues and Regulatory Aspects in the European Union, 2022. P 437-450.
15. Food safety and standards authority of India. Good food laboratory practices (GFLPs) [Internet]. New Delhi: Ministry of health and family welfare, Government of India.; 2023 [citado 11 de diciembre de 2025] p. 41. Disponible en: https://fssai.gov.in/upload/uploadfiles/files/Manual_GFLP_06_09_2018.pdf
16. Fornés DT, López-Molina N, Marrón NP. Análisis microbiológico de los alimentos. Guía de aplicación de normas ISO. Madrid: AENOR CONOCIMIENTO, S.L.U.; 2022. 248 p.
17. FSAAI. *Good Food Laboratory Practices (GFLPs)*. Food Safety and Standards Authority of India. Ministry Of Health and Family Welfare. Government of India. New Delhi. 2018
18. Gasca León MI. Aseguramiento de la calidad en los ensayos microbiológicos cualitativos [Internet] [Magister en ingeniería]. [Mexico DF]: UNAM; 2013 [citado 11 de diciembre de 2025]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14330/TES01000696082>
19. Guía para la Evaluación de Métodos Microbiológicos. Serie 1. Alimentos. https://inm.gov.co/web/wp-content/uploads/2023/11/Guia_microbiologia_INM.pdf
20. INN. NCh 2047 Of. 2021, Microbiología de los alimentos para consume humano y animal- Requisitos generales y orientación para el análisis microbiológico.
21. INN. NCh 426/2. Agua grado reactivo para análisis - Especificaciones - Parte 2: Análisis físico-químico y microbiológico de agua potable, aguas crudas y aguas residuales. 1997.
22. Instituto de Salud Pública de Chile [Internet]. [citado 11 de diciembre de 2025]. Instituto de Salud Pública de Chile. Disponible en: <https://ispch.cl/>
23. ISO. ISO 14644-1:2015. *Cleanrooms and associated controlled environments. Part 1: Classification of air cleanliness by particle concentration*. www.iso.org
24. ISO. ISO 16140-1:2016 *Microbiology of the food chain — Method validation. Part 1: Vocabulary*. www.iso.org
25. ISO. ISO 3696:1987. *Water for analytical laboratory use — Specification and test methods*. www.iso.org

26. ISO. ISO 5725-1:2023(en). *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions*. www.iso.org
27. ISO. ISO 7218:2024 *Microbiology of the food chain — General requirements and guidance for microbiological examinations*. www.iso.org
28. ISO. ISO 9000:2015(en). *Quality management systems — Fundamentals and vocabulary*. www.iso.org
29. ISO. ISO/IEC 17000:2020(es)- Evaluación de la conformidad — Vocabulario y principios generales. www.iso.org
30. ISO. ISO/IEC 17025. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayos y calibración. 2017. www.iso.org
31. ISO/TEC 34/SC9 *Foods products-Microbiology. Colony count techniques (CCT) calculator*. <https://committee.iso.org/sites/tc34sc9/home/general-standards/content-left-area/culture-media/iso-7218-general-requirements-an.html>
32. ISP. DSO. Evaluación de áreas biolimpias de manejo de agentes antineoplásicos. www.ispch.gob.cl
33. Lara C. Manual de Prácticas de Microbiología [Internet]. Yucatán, México: Instituto tecnológico superior del sur del estado de Yucatán; [citado 11 de diciembre de 2025] p. 64. Report No.: ITSSY-IT-AC-11. Disponible en: <https://suryucatan.tecnm.mx/wp-content/uploads/2021/03/Manual-de-Practicas-de-Microbiologia.pdf>
34. Magnusson B, Tsimillis K, editores. Accreditation for Microbiological Laboratories [Internet]. Tercera edición. Eurachem; 2023 [citado 11 de diciembre de 2025]. 53 p. Disponible en: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/Eurachem_Guide_AML_2023_EN.pdf
35. Ramos M., Pérez M. Manual de Practicas del laboratorio de Microbiología General. Universidad Autónoma Metropolitana. Departamento de Biotecnología. México. 2004.
36. Mastromónaco G. Criterios para asegurar la trazabilidad y calidad de los cultivos microbianos de referencia [Internet] [Magister en Calidad Industrial]. [Buenos Aires, Argentina,]: Universidad Nacional de San Martín; 2015 [citado 11 de diciembre de 2025]. Disponible en: <https://www.unsam.edu.ar/institutos/incalin/repositorio/Maestria/GladysMastromonaco.pdf>
37. Ministerio de defensa nacional chile. Implementa la convención sobre la prohibición del desarrollo, la producción, el almacenamiento y el empleo de armas químicas y sobre su destrucción y la convención sobre la prohibición del desarrollo, la producción y el almacenamiento de armas bacteriológicas (biológicas) y toxínicas y sobre su destrucción [Internet]. Ley 21250 ago. 17, 2020 p. 16. Disponible en: <https://www.bcn.cl/leychile>
38. Ministerio de Salud C, Ministerio de salud; Subsecretaría de salud pública. Aprueba reglamento de calderas, autoclaves y equipos que utilizan vapor de agua. [Internet]. Decreto 10 oct 19, 2013. Disponible en: <https://www.bcn.cl/leychile>

39. Ministerio de Salud C. Aprueba reglamento sanitario de los alimentos [Internet]. Decreto 977 may. 13, 1997 p. 219. Disponible en: <https://www.bcn.cl/leychile>
40. Ministerio de Salud C. Aprueba reglamento sobre manejo de residuos de establecimientos de atención de salud (REAS) [Internet]. Decreto 6 dic 4, 2009 p. 17. Disponible en: <https://www.bcn.cl/leychile>
41. Ministerio de Salud C. Biblioteca del Congreso Nacional | Ley Chile [Internet]. Decreto 173 oct 20, 1982 p. 4. Disponible en: <https://www.bcn.cl/leychile>
42. MINSAL. Decreto 173. Reglamenta autorización de laboratorios que certifiquen la calidad de elementos de protección personal contra riesgos ocupacionales. Ministerio de Salud. 1982. www.bcn.cl
43. Morato M, Leguizamón J, Rojas F. Guía: Para la evaluación de métodos microbiológicos. [Internet]. Bogotá, Colombia: Instituto Nacional de Metrología; 2023 [citado 11 de diciembre de 2025]. (Alimentos). Disponible en: https://inm.gov.co/wp-content/uploads/2023/11/Guia_microbiologia_INM.pdf
44. Nambisan P. Laboratory Biosafety and Good Laboratory Practices. En: An Introduction to Ethical, Safety and Intellectual Property Rights Issues in Biotechnology [Internet]. s.l.: Academic Press; 2017 [citado 11 de diciembre de 2025]. p. 253–71. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128092316000119>
45. OIE OMSA. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los Animales Terrestres: (Mamíferos, aves y abejas). 5ed. Paris: Office International Des Epizooties, 2004.
46. OMS. Anexo 1: Buenas Prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos. Serie de informes técnicos de la OMS, N°. 957, 2010.
47. OMS. Laboratory biosafety manual, fourth edition. Geneva: World Health Organization; 2020.
48. OMS. Red PARF Documento técnico 11. Buenas Prácticas de la OMS para Laboratorios de Microbiología Farmacéutica. Washington DC. 2013. P.
49. UNE-EN ISO 11133 Microbiología de los alimentos para consumo humano, alimentación animal y agua. Preparación, producción, conservación y ensayos de rendimiento de los medios de cultivo.
50. UNODC. Glosario de términos sobre garantía de calidad y buenas prácticas de laboratorio. Naciones Unidas. 2012.
51. USDA. *Laboratory Guidebook. MLG Appendix 1.15. Media and Reagents*. United States department of Agriculture. 12 diciembre 2024.
52. Valenzuela M. Evaluación de áreas biolimpias de manejo de agentes antineoplásicos [Internet]. Santiago de Chile: Instituto de Salud Pública de Chile; [citado 11 de diciembre de 2025] p. 13. Disponible en: https://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2011/01/Areas%2520Biolimpias.pdf
53. World Data Center for Microorganisms. www.wdcm.org



Instituto de
Salud Pública
Ministerio de Salud

Gobierno de Chile