

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



Validación secundaria del método: "ISO 11290 -  
1:1996/Amd 1:2004 Microbiología de los alimentos y  
piensos para la detección y enumeración de *Listeria  
monocytogenes*", en hisopados de superficie inerte.

Certificaciones del Perú, S.A. Lima 2014.

**TESIS PARA OBTENER EL TITULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGA con mención en la especialidad de  
BIOTECNOLOGÍA**

**Presentado por la:  
Bach. VERA RAMIREZ, Mélody**

**AYACUCHO - PERÚ  
2014**

Tesis  
B701  
Ver

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

R.D.N° 206-2014-UNSCH-FCB-D


Bach. MÉLODY VERA RAMÍREZ

En la ciudad de Ayacucho , el día veintiocho de noviembre del dos mil catorce, siendo las cuatro de la tarde, en el Auditorio del Departamento de Ciencias Biológicas, reunidos los miembros del jurado calificador presididos por el Dr. Segundo Tomás Castro Carranza en condición de Decano- Presidente y como miembros la Mg. Vidalina Andía Ayme, Mg. Aurelio Carrasco Venegas y Mg. Serapio Romero Gavilán con la finalidad de recepcionar el trabajo de tesis titulado "Validación secundaria del método ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004 Microbiología de los alimentos y piensos método horizontal para detección y enumeración de *Listeria monocytogenes*" en hisopados de superficie inerte. Certificaciones del Perú S.A. Lima 2014, presentado por la bachiller Méloody Vera Ramírez, con la que pretende obtener el título profesional de Biólogo con Especialidad de Biotecnología. Acto seguido el Sr, Decano de la Facultad previa conformidad de la documentación sustentadora del presente acto, autoriza a la sustentante para dar inicio a su sustentación en un tiempo máximo de cuarenta y cinco minutos. La sustentante inició el proceso saludando a los presentes, presentando el trabajo, dedicatoria, agradecimiento, introducción, objetivos, marco teórico, metodología, resultados y discusión, conclusiones, recomendaciones y finalizando con los anexos. Concluido esta fase el Sr. Decano invitó a los miembros del jurado a plantear correcciones, aclaraciones y preguntas que consideren pertinentes, para que pueda ser defendido por la sustentante y público asistente a abandonar el Auditorio a fin de que el jurado pudes deliberar la calificación respectiva, obteniendo los siguientes resultados:

MIEMBRO EVALUADOR	EXPOSICIÓN	PREGUNTAS	PROMEDIO
Mg. Vidalina Andía Ayme	18	17	18
Mg. Aurelio Carrasco Venegas	18	18	18
Dr. Segundo Tomás Castro Carranza	18	18	18
Mg. Serapio Romero Gavilán	17	17	17
Promedio:			18

Concluido la calificación se obtiene el promedio de Dieciocho (18) luego se invitó a la sustentante y al público asistente a ingresar al Auditorio con la finalidad de dar a conocer el resultado y a la vez colocar la medalla y toma de la juramentación respectivo.


Concluido con el acto los miembros del jurado evaluador firmamos al pie del presente documento, dando fe al mismo Finaliza la sustentación siendo siete de la noche.



Dr. SEGUNDO TOMAS CASTRO CARRANZA  
Decano de la F.C.B



Mg. VIDALINA ANDIA AYME  
Miembro



Mg. AURELIO CARRASCO VENEGAS  
Miembro - secretario



Mg. SERAPIO ROMERO GAVILAN  
Miembro

*A mis padres y hermanos  
A los docentes de la Facultad de  
Ciencias Biológicas  
A mis amigos.*

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por permitirme en sus recintos desarrollarme como profesional.

A la empresa Certificaciones del Perú por permitirme laborar en sus laboratorios.

A la Ing. Gloria Reyes por permitirme laborar en la empresa CERPER SAC.

A mis docentes por impartir sus conocimientos y brindarme su apoyo incondicional.

Mi especial agradecimiento a mi asesor Dr. Homero Anco Aguilar por su colaboración y consejos permanentes en la culminación del presente trabajo de tesis.

A mis padres por todo el esfuerzo denodado que me brindaron durante mi vida universitaria.

## ÍNDICE

	Página
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	
2.1. Antecedentes	3
2.2. Validación	5
2.3. Validación Primaria	5
2.4. Validación Secundaria	5
2.5. Parámetros analíticos para la validación de una técnica o método	6
2.6. ISO	7
2.7. Sistema de gestión de calidad	7
2.8. Control de calidad	7
2.9. Calidad en la industria alimentaria	8
2.10. Contaminación microbiana en la industria alimentaria	8
2.11. Análisis microbiológico de superficies	9
2.12. <i>Listeria monocytogenes</i>	10
2.13. Detección microbiológico de <i>Listeria monocytogenes</i> en la Industria alimentaria	11
III. MATERIAL Y MÉTODOS	15
IV. RESULTADOS	29
V. DISCUSIÓN	41
VI. CONCLUSIONES	47
VII. RECOMENDACIONES	49
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS	53

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>	
Tabla 1	Áreas de trabajo de monitoreo ambiental	16
Tabla 2	Límites microbiológicos permisibles para los ambientes	17
Tabla 3	Temperaturas y Humedad relativa promedios de trabajo	18
Tabla 4	Temperaturas y tiempos de incubación de los medios de cultivo selectivo	21
Tabla 5	Valores de la tasa de productividad esperada de los medios de cultivo selectivo	21
Tabla 6	Tabla de contingencia para la evaluación estadística de los parámetros de la superficie irregular	27
Tabla 7	Tabla de contingencia para la evaluación estadística de los parámetros de la superficie regular	27
Tabla 8	Promedio de resultados del control microbiológico ambiental	30
Tabla 9	Temperaturas de trabajo establecidos en los equipos	31
Tabla 10	Evaluación de la productividad y selectividad de medios de cultivo líquidos de enriquecimiento selectivo	32
Tabla 11	Evaluación de la productividad y selectividad de medios de cultivo selectivo sólidos (agar ALOA)	33
Tabla 12	Evaluación de la productividad y selectividad de medios de cultivo selectivo sólidos (agar PALCAM)	34
Tabla 13	Evaluación de la productividad y selectividad de medios de cultivo no selectivo sólido y líquido (agar TSAYE y caldo TSBYE)	35
Tabla 14	Determinación de la concentración de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Escherichia coli</i> para la inoculación de las matrices	36
Tabla 15	Tabla de contingencia de los resultados experimentales de las muestras inoculadas de las superficies inertes irregulares	37
Tabla 16	Determinación de los parámetros cualitativos de las superficies inertes irregulares	38
Tabla 17	Tabla de contingencia de los resultados experimentales de las muestras inoculadas de las superficies inertes regulares	39
Tabla 18	Determinación de los parámetros cualitativos de las superficies inertes regulares	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1 Representación esquemática de la infección por <i>Listeria monocytogenes</i>	11
Figura 2 Método correcto de inoculación	22

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Página</b>
Anexo 1 Método ISO 11290-1:1996/AMENDMENT 1:2004	58
Anexo 2 Método ISO 11290/AMENDMENT 1:2004	72
Anexo 3 Método ISO 18593	79
Anexo 4 RM- N° 461-2007/MINSA Guía Técnica para el Análisis microbiológico de superficies en contacto con alimentos y bebidas	86
Anexo 5 Registros de monitoreo microbiológico ambiental	96
Anexo 6 Registros de temperatura de equipos de trabajo	101
Anexo 7 Certificados de calibración de los equipos de trabajo	107
Anexo 8 Carta de control de temperatura y humedad ambiental	123
Anexo 9 Resultados de la concentración del inóculo del microorganismo objetivo y del microorganismo no objetivo	132
Anexo 10 Pruebas estadísticas a los resultados preliminares	135
Anexo 11 Pruebas estadísticas aplicadas a los resultados	137
Anexo 12 Formato de los resultados del método ISO 11290-1:1996/AMENDMENT 1:2004.	143
Anexo 13 Instructivo de los procesos operativos no especificados en el método ISO 11290-1:1996/AMENDMENT 1:2004	145
Anexo 14 Metodología del proceso de detección de <i>Listeria monocytogenes</i>	147
Anexo 15 Procedimiento de la determinación de la concentración del inóculo objetivo y no objetivo	148
Anexo 16 Crecimiento del microorganismo objetivo y no objetivo en medios de cultivo selectivo y no selectivo	149
Anexo 17 Inoculación del microorganismo objetivo y no objetivo en superficies inertes irregulares y regulares	150
Anexo 18 Bioquímica de <i>Listeria monocytogenes</i> según el método ISO 11290	151

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de la empresa Certificaciones del Perú, S.A. en el área de microbiología, con el objetivo de realizar la validación secundaria del método, Lima 2014, para lo cual se trabajó con microorganismos estándares sugeridos por el método ISO. Durante todo el proceso experimental de la validación secundaria los resultados del control microbiológico ambiental se encontraron dentro de los límites máximos permisibles ya que el crecimiento microbiano fue  $\leq 15$  UFC/placa, las temperaturas de los equipos se encontraron dentro de los rangos de trabajo establecidos para cada equipo, la temperatura y humedad ambiental se encontró dentro de los rangos establecidos por cada área de trabajo, la selectividad y productividad de los medios de cultivo fueron satisfactorios, la productividad del caldo fraser (enriquecimiento primario y enriquecimiento secundario) fue  $>10$  ya que tuvo crecimiento del microorganismo objetivo en agar ALOA y PALCAM, la selectividad también fue satisfactoria ya que no existe crecimiento del microorganismo no objetivo en agar no selectivo (TSA). La tasa de productividad del agar ALOA fue de 0.76 por lo tanto es satisfactoria ya que la tasa de productividad esperada es  $\geq 0.5$ , selectividad fue satisfactoria porque hubo inhibición total del microorganismo no objetivo, La tasa de productividad del agar PALCAM fue de 0.78 y la selectividad fue satisfactoria porque hubo inhibición total del microorganismo no objetivo. La Productividad del agar y del caldo Soya tripticasa + extracto de levadura fue satisfactoria con una puntuación de 2 debido al buen crecimiento del microorganismo objetivo. Para los ensayos preliminares se analizaron dos muestras de cada matriz por duplicado, para la obtención de la data participaron 7 analistas donde se obtuvieron 35 datos 5 datos por analista. Para el caso de superficies regulares se inocularon las cepas objetivo (*Listeria monocytogenes*) y las cepas no objetivo (*E. coli*) en plantillas de material espumado y se procedió según el método de la esponja, para el caso de superficies inertes irregulares se inocularon a contenedores y se procedió según el método del enjuague, los resultados preliminares fueron satisfactorios para cada matriz cumpliendo el criterio de que el duplicado coincide con el resultado. Los resultados obtenidos con el método estuvieron conforme a los esperados ya que la proporción de los resultados son concordantes con los esperados que es 100%. Se demostró que el método es específico porque se verificó, al 95% de confianza, que la proporción de verdaderos negativos recuperados es 100%, también se demostró que el método es sensible porque se verificó al 95% que la proporción de verdaderos positivos es 100%, se demostró también que el método es exacto (veraces y precisos). Por lo tanto el método se considera reproducible generando así resultados confiables y precisos.

**Palabras clave:** validación secundaria, *Listeria monocytogenes*, superficies inertes.

## I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se ha generado una gran aceptación e interés por los temas relacionados con seguridad y calidad alimentaria, teniendo presente que estos son productos vitales para la salud.

El análisis microbiológico cobra gran importancia al ser un punto álgido en la elaboración y distribución de los alimentos, por esta razón el laboratorio encargado del análisis debe mantener estándares de calidad aceptables en el procesamiento de muestras y en los resultados que emiten sus técnicas para garantizar la seguridad e inocuidad de los alimentos, para ello recurre a la verificación y validación de nuevos métodos.

La validación secundaria en los laboratorios de ensayo ha venido tomando gran importancia, con el fin de desarrollar sistemas rigurosos de calidad que proporcionen y aseguren al consumidor un producto de alta calidad que cumpla con las especificaciones.

La validación secundaria es la aportación de evidencias objetivas de que el método cumple con los requerimientos especificados para el uso previsto.

En la verificación o validación secundaria no se necesita una evaluación rigurosa de los parámetros de desempeño del método. El laboratorio solo necesita conocer las especificaciones del método normalizado a partir de los datos de validación que se reportan, tener analistas competentes, instrumentación calibrada, el medio ambiente e instalaciones apropiadas, y los materiales de referencia y reactivos necesarios para efectuar el proceso de verificación.<sup>1</sup>

Las especificaciones tomadas en cuenta en la validación secundaria son: la

sensibilidad, especificidad, exactitud y precisión que permitirán observar el desempeño del método.

Esta validación de técnicas microbiológicas, es de suma importancia ya que ayuda a la regulación, a la reducción de costos en el laboratorio y como requisito para dar cumplimiento a normas tan específicas como la norma ISO/IEC 17025, la cual es de vital cumplimiento en el proceso de acreditación del laboratorio.

#### **OBJETIVO GENERAL**

- Realizar la validación secundaria del método microbiológico: "ISO 11290 - 1:1996/Amd 1:2004 Microbiología de los alimentos y piensos para la detección y enumeración de *Listeria monocytogenes*", en hisopados de superficie inerte que ingresan a la empresa Certificaciones del Perú, S.A.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Realizar el monitoreo de las condiciones microbiológicas del ambiente de trabajo y verificación de la calibración de los equipos.
- Evaluar la productividad y selectividad de los medios de cultivo utilizados para *Listeria monocytogenes*.
- Determinar la especificidad, sensibilidad y la exactitud relativa del método.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. ANTECEDENTES

La práctica de la verificación de la calidad se remonta a épocas anteriores al nacimiento de Cristo. En el año 2150 A.C., la calidad en la construcción de casas estaba regida por el Código de Hammurabi, cuya regla # 229 establecía que "si un constructor construye una casa y no lo hace con buena resistencia y la casa se derrumba y mata a los ocupantes, el constructor debe ser ejecutado".

A principios del siglo XX cuando el concepto de calidad se asoció con lograr producir lo que se necesitara y que al final del proceso se inspeccionara cada producto terminado, desechando aquello que no cumpliera con los requerimientos determinados.<sup>2</sup>

Con los cambios sociopolíticos que se dieron a principios del siglo XX que desembocaron en las guerras mundiales, el concepto de calidad varió hacia la búsqueda de lograr obtener el objeto deseado en el momento justo y en la cantidad justa, introduciendo la segunda etapa en la evolución de la gestión de calidad, el control estadístico de la calidad.<sup>3</sup>

En el periodo de guerras apareció la figura de W. A. Shewhart. En 1931 publica "Economía de control de calidad en los productos fabricados", en el cual utiliza el control estadístico de la calidad como medio para crear los gráficos de control que permiten determinar si un proceso se encuentra funcionando dentro de sus requerimientos. En su libro Shewhart demuestra que existen variaciones en los procesos que imposibilitan que se haga siempre igual, por lo que propone buscar límites aceptables para la producción, o límites de aceptación, que podían visualizarse a través de los gráficos de control.<sup>4</sup>

Una vez que en 1945 se terminó la guerra, muchos países volvieron al método de trabajo predominante durante la época de la Revolución Industrial, el cual era producir y producir hasta satisfacer la demanda de muchos productos que habían dejado de hacerse debido al desvío de materias primas hacia la producción militar. Sin embargo, en Japón se gestó un cambio en esta mentalidad debido a los aportes de W. Edwards Deming, Joseph Juran y otras personas; enviadas a ayudar en la reconstrucción del país oriental después de su derrota en la guerra. En los inicios de la década de 1950, ellos introdujeron técnicas y nociones sobre calidad distintas a las que estaban siendo utilizadas en el resto del mundo junto con lecciones estructuradas sobre los problemas y enfoques de cómo resolverlos. Esta es la etapa del aseguramiento de la calidad. Ellos, junto con la JUSE (Unión Japonesa de Científicos e Ingenieros), empezaron a diseminar la idea de hacer las cosas bien desde la primera vez, para así disminuir costos, satisfacer al cliente y lograr un nivel de competitividad acorde a las exigencias del mercado, con lo cual diferenciaron esta etapa de la evolución de la gestión de calidad, ya que además de contar con límites de aceptación, buscaban controlar y minimizar el efecto de las causas de esos problemas o variaciones que presentó Shewhart.

Deming era un discípulo de Shewhart, quien había creado un ciclo de mejora conocido ahora como Ciclo PDCA o PHVA por sus siglas en español (Planear, Hacer, Verificar, Actuar) o Ciclo Deming, debido a que fue él quien lo dio a conocer a nivel mundial. Además desarrolló 14 puntos para mejorar la administración de las organizaciones y enunció las 7 enfermedades mortales que atacan a toda empresa.

En 1962 Ishikawa fue el formulador de los círculos de calidad, como método para la resolución de problemas, y creó el Diagrama Causa-Efecto (Diagrama Ishikawa) para determinar las fuentes raíz de los problemas.

John Oakland conjuntó las ideas más representativas de la calidad, según los diferentes expertos mundiales, en un modelo que llamó calidad total en su libro Administración Total de la Calidad en 1993. Así, según la Sociedad para la Promoción y Reconstrucción Industrial, la calidad total es una conjunción de ideas que forman "un sistema de gestión o filosofía gerencial a través del cual las organizaciones satisfacen las necesidades y expectativas del usuario, de sus empleados, de los accionistas y de toda la sociedad en general, utilizando los

recursos de los que disponen: personas, materiales, tecnología, sistemas productivos, etc.”

Sin embargo, esto no ha terminado y el concepto de calidad sigue evolucionando, por lo que es un esquema abierto y variable, que va respondiendo a las necesidades de la sociedad y que cambia según los adelantos tanto teóricos como prácticos.<sup>5</sup>

## **2.2. VALIDACIÓN**

Es el proceso por el cual se establecen mediante estudios de laboratorio que las características de desempeño del método analítico cumplen requerimientos para la aplicación analítica propuesta, es decir, para detectar o cuantificar grupos microbianos específicos como es el caso, siendo su principal objetivo confirmar y documentar la confiabilidad de los resultados obtenidos.<sup>6</sup>

Consiste en establecer evidencia documentada que proporcione un alto grado de aseguramiento de que un proceso específico producirá consistentemente un producto que cumpla con sus especificaciones y atributos de calidad predeterminados.<sup>6</sup>

## **2.3. VALIDACIÓN PRIMARIA**

La validación primaria es un proceso exploratorio que tiene como metas establecer los límites operacionales y las características de desempeño de método nuevo, modificado o caracterizado en forma inadecuada. Debe dar origen a especificaciones numéricas y descriptivas para el desempeño e incluir una descripción detallada y precisa del objeto de interés.

Característicamente, la validación primaria procede mediante el uso de esquemas de ensayo especialmente diseñados.<sup>7</sup>

## **2.4. VALIDACIÓN SECUNDARIA**

La validación secundaria tiene lugar cuando un laboratorio procede a implementar un método desarrollado en otra parte. Esta validación se centra en la reunión de evidencia acerca de que el laboratorio está en la capacidad de cumplir las especificaciones establecidas en la validación primaria. Suele llamarse verificación; y es la confirmación, mediante el aporte de pruebas objetivas, que se han cumplido con los requisitos establecidos.<sup>8</sup>

Es importante para un laboratorio de análisis, validar sus técnicas para así optimizar sus procesos, lo cual implica reducir sus gastos, el tiempo de desarrollo de la técnica y generar confiabilidad en los resultados que se emiten. Asimismo sirve para dar cumplimiento a las normas legales pertinentes o al logro del cumplimiento de normas que aunque no son de obligatorio acatamiento contribuyen a la credibilidad del laboratorio y a obtener altos niveles de calidad que generen confianza dentro de sus clientes.<sup>9</sup>

## 2.5. PARAMETROS ANALÍTICOS PARA LA VALIDACIÓN SECUNDARIA DE UNA TÉCNICA O MÉTODO

Son las propiedades, características o capacidades del método

**ESPECIFICIDAD.** Es la capacidad del método para diferenciar precisa y específicamente el compuesto de interés, en presencia de los demás componentes, que se espera estén presentes en la matriz de la muestra.

Capacidad o habilidad de un *test screening* de detectar muestras negativas cuando realmente son negativas.<sup>10</sup>

**EXACTITUD.** La exactitud, es la cercanía de un resultado al valor verdadero por comparación con los valores de referencia de un material caracterizado (material de referencia). Los valores de referencia deberían ser trazables a las normas internacionales; los materiales de referencia certificados (MRC) generalmente se aceptan como trazables. Es ideal que el material de referencia sea de matriz natural lo más similar posible a las muestras de interés. Usualmente, la exactitud se expresa como porcentaje de recuperación de los microorganismos mediante el método de validación.<sup>11</sup>

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

Mide el grado de cercanía entre las medidas obtenidas de análisis realizados repetidamente de múltiples muestreos de una muestra homogénea.<sup>11</sup>

**SELECTIVIDAD.** La selectividad es el grado en que un método puede cuantificar el analito con precisión en presencia de interferentes. En muchos tipos de análisis, la selectividad es esencialmente un estudio cualitativo basado en la significación, o bien un conjunto de pruebas pertinentes de interferencia. Capacidad o habilidad de un test de *screening* detectar muestras positivas cuando realmente son positivas.<sup>12</sup>

## **2.6. ISO**

ISO (Organización Internacional de Normalización) es una federación mundial de organismos nacionales de normalización (organismos miembros de ISO). El trabajo de preparación de las Normas Internacionales normalmente se realiza a través de los comités técnicos de ISO. Cada organismo miembro interesado en una materia para la cual se haya establecido un comité técnico, tiene el derecho de estar representado en dicho comité. Las organizaciones internacionales, públicas y privadas, en coordinación con ISO, también participan en el trabajo. ISO colabora estrechamente con la Comisión Electrotécnica Internacional (IEC) en todas las materias de normalización electrotécnica.<sup>13</sup>

## **2.7. SISTEMA DE GESTION DE LA CALIDAD**

La norma ISO 9000 define el sistema de calidad como: "Conjunto de la estructura de la organización, de responsabilidades, de los procedimientos, de los procesos y de los recursos que se establecen para llevar a cabo la gestión de la calidad".

Este conjunto consiste en la definición de un método de trabajo que asegure que los servicios prestados cumplen con las especificaciones previamente establecidas en función de las necesidades del cliente. Un sistema de calidad identifica, coordina y mantiene las actividades necesarias para que los productos/servicios cumplan con los requisitos de calidad establecidos sin tener en cuenta donde estas actividades se producen.<sup>14</sup>

## **2.8. CONTROL DE CALIDAD**

El control de calidad es una parte de las Buenas Prácticas de Manufactura que agrupa las normas acerca de organización, documentación y procesos como muestreo, fabricación, análisis y evaluación de todos los factores que

intervienen en el proceso productivo, asegurando que cada proceso es llevado a cabo bajo las condiciones que garantizan que los materiales y productos son liberados para su uso, venta o suministro con un alto nivel de calidad que ha sido juzgado como satisfactorio. El control de calidad no está confinado a operaciones de laboratorio, debe estar involucrado en todas las decisiones concernientes a la calidad de producto.<sup>15</sup>

## **2.9. CALIDAD EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA**

Conjunto de atributos que hacen referencia de una parte a la presentación, composición y pureza, tratamiento tecnológico y conservación que hacen del alimento algo más o menos apetecible al consumidor y por otra parte al aspecto sanitario y valor nutritivo del alimento.

Para la industria agroalimentaria es importante definir los atributos de calidad más valorados por cada grupo de consumidores, su importancia relativa y cómo se evalúan. Una vez definidos, la principal preocupación de la empresa es conseguir la producción y el suministro continuo de un producto con niveles de calidad en continua mejora. Los sistemas de aseguramiento de la calidad se desarrollaron para mantener a lo largo del tiempo las características de calidad fijadas, de tal manera que el consumidor establezca una asociación perdurable entre la marca o el producto y un determinado nivel de calidad. Para conseguir esa homogeneidad en el producto final se necesita disponer de información de todo lo que sucede en cada fase de la cadena. La industria de alimentos ha implantado esquemas globales de garantía y gestión de la calidad como el APPCC o HACCP, las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM o GMP) o ha adaptado los modelos desarrollados inicialmente para otros sectores industriales (normas ISO). Los sistemas ISO y APPCC son preventivos y su carácter documental permite hacer auditorías y homologar las industrias, facilitando el comercio y mejorando los estándares.<sup>16</sup>

## **2.10. CONTAMINACIÓN MICROBIANA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA**

Una de las causas más importantes de la presencia de peligros biológicos en la industria alimentaria son las contaminaciones cruzadas. Un estudio realizado por la Organización mundial de la Salud, en el ámbito europeo, determinó que el 25% son de los brotes de toxiinfección.

Por contaminación cruzada se entiende la transmisión de microorganismos de un alimento a otro en forma directa o indirecta. Y adquiere su máximo riesgo, cuando se produce desde alimentos crudos a alimentos elaborados. En este caso los posibles patógenos se encuentran con muy pocas barreras y pueden multiplicarse siempre y cuando se den las condiciones adecuadas.

Las superficies son una de las vías de contaminación de los alimentos más frecuentes tanto en la industria alimentaria, en la restauración colectiva, así como en el hogar. Las bacterias que colonizan las superficies pueden actuar como un reservorio de microorganismos alterantes, *Pseudomona aeruginosa* y/o patógenos como por ejemplo: *S. aureus* o *L. monocytogenes*.

Hoy en día la vigilancia y control de la contaminación microbiana de las superficies está adquiriendo un interés creciente debido en parte a la notificación de brotes alimentarios cuyas vías de contaminación implicadas han sido superficies, equipos y/o utensilios de contacto con el alimento contaminado.<sup>17</sup>

## **2.11. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE SUPERFICIES**

El análisis microbiológico ambiental y de superficies en la industria de los alimentos se constituye en una herramienta básica para el control de materias primas, procesos, productos y manipuladores, ya que permite establecer el grado de contaminación biológica de estos, por esta razón el control microbiológico es parte fundamental en todo el proceso.<sup>18</sup>

Los principales objetivos del análisis microbiológico son:

Asegurar que el alimento cumpla con las normas estatutarias.

- Que se ajuste a normas internas establecidas por la empresa que los proceda y a las que exige el comprador.
- Que las materias alimenticias que llegan a la fábrica para ser procesadas cumplan con las normas exigidas y pactadas con el productor.
- Que se mantenga el control del proceso y la higiene de la línea de fabricación.<sup>19</sup>

Los métodos de examen microbiológico utilizados para controlar la calidad del alimento son en sí mismos muy variados y dependientes, en gran parte del alimento que va a ser analizado.<sup>20</sup>

## 2.12. *Listeria monocytogenes*

### ORIGEN Y DESCRIPCIÓN

El género *Listeria* spp recibe su nombre en honor del cirujano británico Lord Joseph Lister y la especie *Listeria monocytogenes* por el síndrome de monocitosis presente en determinados enfermos de listeriosis.<sup>21</sup>

La primera descripción de listeriosis en los humanos fue realizada por Nyfeldt en 1929 el cual aisló esta bacteria a partir de sangre de pacientes que sufrían una enfermedad parecida a la mononucleosis infecciosa. En 1936, Burn, aisló el microorganismo de cadáveres de neonatos e implicó a la bacteria como causa de meningitis en adultos. En 1936 se reconoció por primera vez *Listeria monocytogenes* como causa de infección humana durante el periodo perinatal y como responsable de meningitis en adultos.<sup>22</sup>

Las listerias son bacilos de forma regular y con forma de vara corta de aproximadamente 0,4-0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro y 0,5-2  $\mu\text{m}$  de longitud con las puntas redondeadas. Algunas veces pueden tener forma cocoide, apareciendo como células individuales o bien cadenas cortas. Pueden ser móviles cuando se cultivan a temperaturas de 20°C - 25°C y esta movilidad está provocada por la presencia de tres o cuatro flagelos de implantación periférica. Estos flagelos pueden tener longitudes de 6 a 20  $\mu\text{m}$  o más.<sup>23</sup>

*Listeria monocytogenes* se ha considerado durante muchos años un patógeno de animales, su papel significativo como patógeno humano transmitido por alimentos sólo se hace evidente a partir de 1980, cuando comienzan a aparecer en la literatura informes documentados de brotes de listeriosis, detectados por consumo de alimentos contaminados.<sup>24</sup>

### TAXONOMÍA

Dominio	: Bacteria
Filo	: Firmicutes
Clase	: Bacilli
Orden	: Bacillales
Familia	: Listeriaceae
Género	: <i>Listeria</i>
Especie	: <i>Listeria monocytogenes</i>

## Listeriosis

La listeriosis humana forma parte del grupo de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), esta enfermedad es esporádica y la ocasiona *Listeria monocytogenes*.

Este microorganismo se ha convertido en un problema de salud pública, y aunque la incidencia está entre 4 y 8 casos por cada 1.000.000 personas, la tasa de mortalidad es alta en comparación con otras ETAs (20 - 30%), (ONU 2000).

Entre las manifestaciones clínicas asociadas a listeriosis se encuentran: meningitis, encefalitis, septicemias y aborto entre otras.<sup>25</sup>

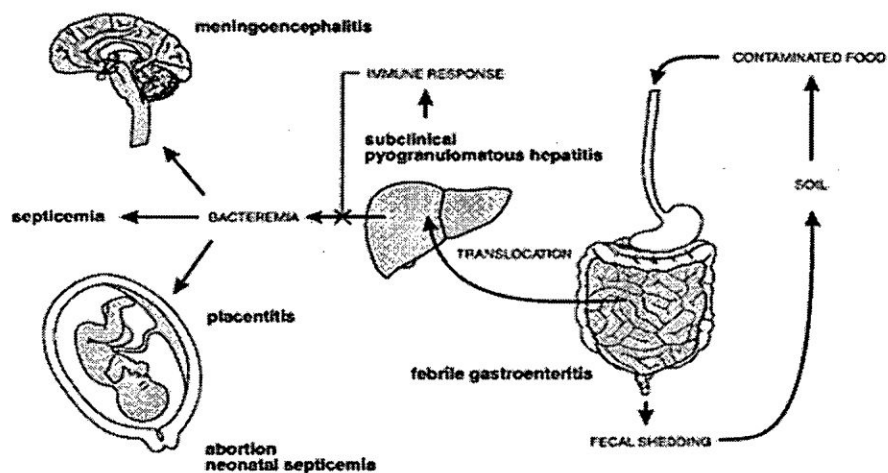


Figura 1. Representación esquemática de la infección por *Listeria monocytogenes*

### 2.13. DETECCIÓN MICROBIOLÓGICO DE *Listeria monocytogenes* EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Las toxiinfecciones alimentarias provocadas por microorganismos patógenos como la listeria tienen gran importancia en los países desarrollados por el gran número de personas infectadas y por la industrialización en la producción de alimentos que favorece la diseminación de estos patógenos.

El aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* a partir de alimentos, superficies vivas e inertes, muestras medioambientales y muestras clínicas procedentes de animales, requiere el uso de agentes selectivos y procedimientos de enriquecimiento que mantengan los niveles de microorganismos contaminantes en valores razonables y permitan la multiplicación de *L. monocytogenes* hasta niveles que sean suficientes para poder detectar este microorganismo.<sup>26</sup>

En la actualidad existen varios métodos convencionales y rápidos disponibles para la detección e identificación de *Listeria monocytogenes* en muestras de alimentos y en muestras procedentes de listeriosis animal.

Los métodos bacteriológicos convencionales son importantes por varias razones: su empleo permite obtener el microorganismo en cultivo puro, lo que será útil con propósitos reglamentarios. Siguen siendo el "patrón de oro" frente a los cuales se comparan y validan otros métodos. Normalmente estos métodos son muy sensibles y no requieren equipamiento sofisticado o caro.

Algunas desventajas de este grupo de métodos incluyen el periodo de tiempo relativamente largo que se necesita para finalizar los protocolos, la experiencia práctica que se precisa en varias manipulaciones, la necesidad de productos químicos, reactivos y medios muy diferentes, la posibilidad de que algunos microorganismos contaminantes enmascaren la presencia de las bacterias diana, incluyendo una posible falta de detección de variantes atípicas del organismo diana y la subjetividad relativa que supone la interpretación del crecimiento bacteriano en placas de agar con un medio selectivo y diferencial.<sup>26</sup>

#### **Detección de *Listeria monocytogenes* en superficies inertes.**

*Listeria monocytogenes* se considera uno de los agentes más importantes de enfermedades de transmisión alimentaria. Las explicaciones posibles de la emergencia de la listeriosis humana que es persistente en los alimentos debido a que crece sobre superficies como condensadores, paredes, techos y utensilios de limpieza en las plantas procesadoras de alimentos sean totalmente involucrados en la contaminación de dicho patógeno, a partir de dichas fuentes, transmitida por alimentos como un asunto del máximo interés de Salud Pública comprenden los cambios importantes en la producción, procesamiento y distribución de los alimentos, la utilización cada vez mayor de la refrigeración como medio de conservación primaria de los alimentos, los cambios en los hábitos de comida de la población, particularmente respecto a la comodidad de los alimentos ya preparados y un incremento del número de personas consideradas de alto riesgo de sufrir la enfermedad (ancianos, gestantes, recién nacidos, inmunodeprimidos).

Los alimentos asociados con mayor frecuencia con la listeriosis humana son los productos listos para consumir, por ser productos con un tiempo de conservación

prolongado a temperatura de refrigeración y que se consumen sin tratamiento listericida previo.<sup>26</sup>

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. LUGAR DE ESTUDIO**

El presente trabajo se investigación, se realizó en los laboratorios de Microbiología de la Empresa Certificaciones del Perú S.A., ubicado en la ciudad de Lima.

#### **3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN: Básico- Descriptivo**

#### **3.3. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN: Transversal Descriptivo**

#### **3.4. MÉTODOS IMPLICADOS EN EL PROCESO DE LA VALIDACION SECUNDARIA**

Para llevar a cabo la validación secundaria se usó el método:

**3.4.1. ISO 11290-1:1996 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal methods for sampling techniques from surface using contact plates and swabs- Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes - Part 1: Detection method (Anexo 1).**

**3.4.2. ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004 Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data.**

De este método ISO se tomará en cuenta todos los ítems descritos en el método excepto el siguiente ítem: 9.6.1.2 (Anexo 2) (Anexo 14).

**3.4.3. MÉTODO ISO 18593: 2004. Parte 8 y 9 excepto 8.1, 8.3.1, 8.3.3, 9.1, 9.2.3 Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal methods for sampling techniques from surface using contact plates and swabs:** Del método ISO 18593 se tomará en cuenta la parte 8 y 9 excepto 8.1, 8.3.1, 8.3.3, 9.1, 9.2.3 (Anexo 3).

**3.4.4. RM- N° 461-2007/MINSA Guía Técnica para el Análisis Microbiológico de superficies en contacto con Alimentos y Bebidas.**

De esta Resolución ministerial del MINSA se tomará en cuenta la parte 7.3.1, 7.3.2, 7.3.3 y 8.2, 8.3 y 8.4 (Anexo 4).

### **3.5. PROCEDIMIENTOS A SEGUIR PARA LA VALIDACIÓN SECUNDARIA**

#### **3.5.1. Determinación de las condiciones de trabajo.**

##### **(a) Monitoreo microbiológico ambiental de trabajo**

El monitoreo ambiental se realizó teniendo en cuenta lo siguiente:

- La evaluación ambiental, se realizó cada semana, de preferencia en las primeras horas de la mañana. Antes de iniciar el monitoreo, se verificó las siguientes condiciones ambientales:
  - Sistema de aire acondicionado en funcionamiento.
  - Cabina de flujo laminar encendida.
  - Haber transcurrido media hora antes de culminada las labores diarias de limpieza.

**Tabla 1.** Áreas de trabajo de monitoreo ambiental del laboratorio de microbiología CERPER. Lima 2014.

Ambiente	Lugar de ensayo
<b>Sala de siembra</b>	Mesa 1
	Mesa 2
	Mesa 3
	Mesa 4
	Mesa 5
	Cabina de flujo laminar
<b>Sala de pases</b>	Mesa 1
	Mesa 2
<b>Sala de preparación de medios de cultivo</b>	Mesa de preparación de medios de cultivo
	Almacén de medios de cultivo y reactivos.

- Se prepararon placas de agar plate count y agar oxitetraciclina glucosa extracto de levadura según las áreas a evaluar. Se secó las superficies de las placas antes de utilizar.
- Se marcó cada juego de placas registrando lugar de ensayo, iniciales del medio de cultivo y fecha.
- Se expuso las placas en cada lugar durante 15 minutos. Un juego de placas sin exponer se mantendrá como control de medios.
- Se cerró las placas e incubó, el agar plate count (PC) a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48h y el agar oxitetraciclina glucosa extracto de levadura (OGY) a  $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 5 días.
- Transcurrido el tiempo de incubación se efectuó la lectura y registró los resultados en el formato código: LE-R-MAN, monitoreo microbiológico ambiental.

**Tabla 2.** Límites microbiológicos permisibles para los ambientes del laboratorio de microbiología de CERPER. Lima 2014.

DETERMINACIÓN	LIMITE
En PC: Bacteria aerobias mesófilas viables	$\leq 15$ UFC/placa/15min
En OGY: Mohos y levaduras	$\leq 15$ UFC/placa/15min

Para el caso de cabina de flujo laminar fué 0 UFC/placa/15min.

**Control de la temperatura y humedad de las áreas y los equipos de trabajo.**

- El personal designado, realizó tres lecturas diarias de temperatura y humedad de su área.
- Luego se registró en la carta control LE-R-CTH "Carta control Temperatura y Humedad"
  - Fecha
  - Temperatura convencionalmente verdadera (TCV)
  - Humedad convencionalmente verdadera (HRCV)
  - Firma del responsable
  - Firma del supervisor

**Para equipos de temperatura (estufas baños de agua mufla, incubadoras y otros):**

- Los datos obtenidos en la tabla de resultados del informe o certificado de la calibración, sirvió para hallar el valor convencionalmente verdadero para un determinado valor en el termómetro del equipo.
- Para cada valor de temperatura de indicación del equipo se halló de temperatura convencionalmente verdadera (TCV) de la columna de temperaturas promedio de la tabla que es el valor promedio corregido de cada sensor utilizado en la calibración. Para obtener la TCV se sacó promedio sólo de los valores de los sensores que cumplen la tolerancia tomando en cuenta la incertidumbre.
- Se registró los datos obtenidos en el formato cálculo de los valores convencionalmente verdaderos LE-R-CVC.

**Tabla 3.** Temperaturas y Humedad relativa promedios de trabajo en los ambientes del laboratorio de microbiología de CERPER. Lima 2014.

Área	Temperatura	Temperaturas promedios de trabajo	Humedad relativa
Sala de incubadoras	18°C - 24°C	21 ± 3°C	Máx 80%
Sala de siembra	18°C - 24°C	21 ± 3°C	Máx 80%
Sala de pases	18°C - 24°C	21 ± 3°C	Máx 80%

**(b) Aseguramiento de calidad de los resultados.**

- Se realizó un control positivo: Medio de cultivo indicado en el método al cual se inoculó la cepa del microorganismo objetivo.
- Se realizó un control negativo: Medio de cultivo indicado en el método al cual se inoculó la cepa del microorganismo no objetivo
- El ensayo se hizo por duplicado: Permite evaluar una muestra ensayada, a fin de comprobar que los resultados obtenidos se ajustan a los esperados.
- Se usó cepas de referencia: Microorganismos definidos por lo menos a nivel de género y especie catalogados y descritos según características y preferiblemente de origen conocido, obtenidos de una colección nacional e internacional conocida.

### 3.3. Determinación del inóculo de *Listeria monocytogenes* para el control de calidad del medio de cultivo TSBYE.

#### **Inóculo de 10 - 100 UFC:** *Listeria monocytogenes* (ML 03)

- Se preparó el inóculo a partir de un cultivo de 24 horas en caldo TSBYE (3mL), sembrado con un asa de 1  $\mu$ L a partir de la cepa de trabajo en refrigeración.
- Se inoculó con un asa de 1  $\mu$ L del cultivo de 24 horas a un tubo con 9 mL de agua peptonada al 0,1% ( $10^0$ ) o el diluyente a evaluar y se homogenizó en vortex (10 segundos).
- Se hizo diluciones decimales hasta la dilución  $10^{-3}$ .
- Se tomó de este tubo 0,1 mL y sembró en placa por diseminación o en el medio de cultivo líquido que se desea evaluar.

#### **Inóculo 100 – 250 UFC:** *Listeria monocytogenes* (ML 03).

- Se preparó el inóculo a partir de un cultivo de 24 horas en caldo TSBYE (3mL), sembrado con un asa de 1  $\mu$ L a partir de la cepa de trabajo en refrigeración.
- Se inoculó con un asa de 1  $\mu$ L del cultivo de 24 horas a un tubo con 9 mL de agua peptonada al 0,1% ( $10^0$ ) o el diluyente a evaluar y se homogenizó en vortex (10 segundos).
- Se realizó diluciones decimales hasta la  $10^{-2}$ .
- Se tomó de este tubo 0,1 mL y sembró en placa por diseminación o en el medio de cultivo líquido que se desea evaluar.

#### **Inóculo >1000 UFC:** *Escherichia coli* (ML 27).

- Se preparó el inóculo a partir de un cultivo de 24 horas en caldo TSBYE (3mL), sembrado con un asa de 1  $\mu$ L a partir de la cepa de trabajo en refrigeración.
- Se inoculó con un asa de 1  $\mu$ L del cultivo de 24 horas a un tubo con 9 mL de agua peptonada al 0,1% ( $10^0$ ) o el diluyente a evaluar y se homogenizó en vortex (10 segundos).
- Se realizó diluciones decimales hasta  $10^{-1}$ .
- Se inoculó 0,1 mL en el medio de cultivo que se desea evaluar

**Inóculo  $10^4 - 10^6$  UFC: *Escherichia coli* (ML 27).**

- Se preparó el inóculo a partir de un cultivo de 24 horas en caldo TSBYE (3mL), sembrado con un asa de 1  $\mu$ L a partir de la cepa de trabajo en refrigeración.
- Se inoculó con un asa de 1  $\mu$ L del cultivo de 24 horas a un tubo con 9 mL de agua peptonada al 0,1% ( $10^0$ ) o el diluyente a evaluar y se homogenizó en vortex (10 segundos).
- A partir del tubo  $10^0$  se inoculó con un asa de 1  $\mu$ L en el medio de cultivo que se desea evaluar.

**Inóculo  $10^3 - 10^4$  UFC: *Listeria monocytogenes* (ML 03).**

- Se Preparó el inóculo a partir de un cultivo de 24 horas en caldo TSBYE (3mL), sembrado con un asa de 1  $\mu$ L a partir de la cepa de trabajo en refrigeración.
- Se Inoculó con un asa de 1  $\mu$ L del cultivo de 24 horas a un tubo con 9 mL de agua peptonada al 0,1% ( $10^0$ ) o el diluyente a evaluar y se homogenizó en vortex (10 segundos).
- Se realizó diluciones decimales hasta  $10^{-1}$ .
- Se inoculó 0,1 ml en el medio de cultivo que se desea evaluar.

**3.5.2. Evaluación de la productividad y selectividad de los medios de cultivo utilizados para *Listeria monocytogenes*.**

**Medios de cultivos selectivos y no selectivos para aislamiento y/o enumeración:** Productividad – especificidad - selectividad - método cuantitativo

- Se seleccionó una placa de agar (agar ALOA y agar PALCAM) del lote preparado.
- Se realizó una serie de diluciones a partir de un cultivo de 24 h de *Listeria monocytogenes* en caldo TSBYE, para obtener un inóculo de 100 - 250 UFC.
- Se sembró por diseminación en la superficie completamente seca de los medios de cultivo sólidos en evaluación y en el medio de cultivo de referencia (TSA), un inóculo del cultivo de trabajo.

**Tabla 4.** Temperaturas y tiempos de incubación de los medios de cultivo selectivo en evaluación. Lima 2014.

Medio de cultivo	Medio de referencia	Temperatura °C	Tiempo de Incubación
Agar ALOA	TSA	37 ± 1°C	24-48h
Agar PALCAM	TSA	37 ± 1°C	24-48h

- Se realizó el conteo de colonias en los medios de cultivo, después de los tiempos de incubación.
- Se calculó la tasa de productividad según:

$$P_R = N_s / N_o$$

Dónde:

$P_R$  : Tasa de productividad

$N_s$  : Es el conteo total de colonias obtenido sobre el medio de cultivo en evaluación (obtenido de 1 o más placas)

$N_o$  : Es el conteo total de colonias obtenido sobre el medio de cultivo de referencia de 1 o más placas y puede ser  $\geq 100$  UFC

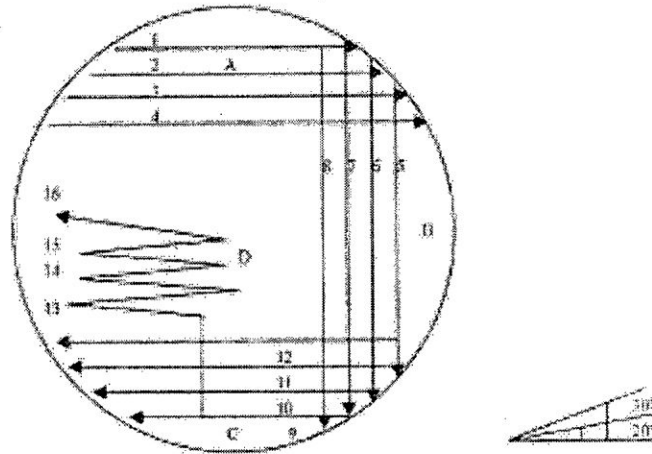
**Tablas 5.** Valores de la tasa de productividad esperada de los medios de cultivo selectivo evaluadas. Lima 2014.

Medio de cultivo	$P_R$ esperado
Agar ALOA	$\geq 0,5$
Agar PALCAM	$\geq 0,5$

**Medios de cultivo de aislamiento no selectivo:** Productividad - método cualitativo

- Se seleccionó una placa de agar TSAYE del lote preparado.
- Se realizó una serie de diluciones a partir de un cultivo de 24 h de *Listeria monocytogenes* en caldo no selectivo (TSBYE) a fin de obtener cultivos con  $10^3 - 10^4$  UFC.
- Se sembró la cepa por estría a través de líneas en paralelo con asa de  $1\mu\text{L}$ , en ángulo de 20 a 30°, en 4 líneas con 0.5 cm de intervalo entre

ellas, de acuerdo a la figura 1, en los sectores A, B, C y D de la placa de cada uno de los medios de cultivo:



**Figura 2.** Método correcto de inoculación.

- Se incubó las placas de TSAYE a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1$  por 18-24h.
- Se realizó las lecturas según el desarrollo en las placas: 0 corresponde a cero crecimiento, 1 a ligero crecimiento y 2 a buen crecimiento
- El microorganismo objetivo: Debe corresponder a un buen desarrollo y tener apariencia típica con tamaño y morfología de la colonia característica (puntaje: 2).

**Medios de cultivo líquidos de enriquecimiento selectivo:** Productividad / selectividad - método semicuantitativo.

- Se seleccionó tres tubos de cada lote de cada uno de los medios a evaluar.
- Se preparó el cultivo de trabajo para el inóculo a partir de un cultivo de 24h en caldo no selectivo.
- Se rotuló un tubo como A y dos como B, para los medios Fraser y Half fraser.

#### **Evaluación de Productividad**

Al tubo A de cada uno de los medios, se inoculó con: 10-100 UFC del microorganismo objetivo (*Listeria monocytogenes*) y  $>1000$  UFC de los microorganismos no objetivos (*Escherichia coli*), en el mismo tubo y homogenizar.

### **Evaluación de Selectividad**

- Al tubo B, se inoculó con un número >1000 UFC del microorganismo no objetivo: se realizó la inoculación en tubos separados por c/u de los microorganismos.
- Se incubó los tubos A y B según el método de ensayo
- Se retiró 10µL del tubo A al agar ALOA y PALCAM se procedió de la misma manera para los tubos B pero estriando en agar TSA, e incubó las placas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $24 \pm 3$  h.

Para realizar las lecturas:

- La Productividad del medio líquido (Fraser y Half fraser) es satisfactoria si al menos 10 colonias del microorganismo objetivo tiene crecimiento en el agar selectivo.
- La Selectividad del medio líquido Fraser y Half-fraser es satisfactorio si no hay crecimiento (o menos de 10 UFC) de microorganismos no objetivo en agar no selectivo.

### **Medios de cultivo líquidos de enriquecimiento no selectivo: Productividad - método cualitativo**

- Se seleccionó un tubo o matraz de cada lote de medio de cultivo del caldo extracto de levadura (TSBYE).
- A partir de un cultivo de 24 horas en caldo no selectivo y con un asa de 1µl se inoculó una azada directamente en el medio de cultivo a prueba, con la cepa *Listeria monocytogenes*.
- Se incubó a  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 8-24h.
- Se realizó las lecturas visualmente y mediante asignación de puntuaciones según crecimiento: Para tubos y botellas.

0 = cero turbidez

1 = muy ligera turbidez

2 = buena turbidez

## 3.6 PROCEDIMIENTO PARA LA INOCULACIÓN DE MUESTRAS PARA ENSAYOS DE SUPERFICIE

### 3.6.1. Preparación del inóculo de trabajo.

- Se preparó el inóculo a partir de un cultivo de 24 horas en caldo TSEYE (3mL) para *L. monocytogenes* y en caldo BHI para *E. coli*, sembrado con un asa de 1 µL a partir de la cepa de trabajo en refrigeración.
- Se inoculó 1 mL del cultivo de 24 horas de a un tubo con 9 mL de agua peptonada al 0,1% ( $10^0$ ) o el diluyente a evaluar y se homogenizó en vortex (10 segundos).
- Se hizo diluciones decimales hasta la dilución  $10^{-7}$  para *L. monocytogenes* y la dilución  $10^{-5}$  para *E. coli*, estas diluciones se homogenizan y corresponde el inóculo de trabajo.
- Para el recuento respectivo se tomó de cada tubo 1 mL y sembró en placa por incorporación, para observar el recuento (Anexo 17).

### 3.6.2. Preparación de materiales e inoculación de las muestras

Materiales a utilizar según el tipo de superficie a inocular:

- Para superficies inertes regulares, se utilizó láminas estériles de plástico, de tamaño adecuado, que brinda un área de tamaño A4.
- Superficies inertes irregulares, se utilizó material de: vasos, cucharas y tapers descartables.
- Se verificó que las superficies estén libres del microorganismo a evaluar, para lo cual se desinfectó la superficie con una solución de alcohol de 70° por 10 minutos y exposición UV por 15 minutos.

### 3.6.3. Tipos de superficie a inocular

#### Superficies inertes regulares:

Se inoculó asépticamente la superficie agregando 0.1 mL del inóculo preparado, el inóculo contiene al microorganismo objetivo (*Listeria monocytogenes*) con un recuento de 10 a 100 UFC y al microorganismo no objetivo (*E. coli* con un recuento >1000 UFC), en diferentes partes de la superficie; se extendió el inóculo con una espátula de Drigalski hasta cubrir la mayor área de 10 x 10cm aprox. Y dejó secar durante 5 minutos.

Para la obtención de la data de la validación secundaria se inocularon 35 esponjas con 10 mL de diluyente.

#### **Superficies inertes irregulares:**

En el caso de utensilios se cubrió el área en contacto con alimentos o la boca. Se retiró la muestra y dejó secar por cinco minutos.

Para los contenedores se seleccionará 4 unidades, colocar dentro del envase un volumen adecuado de diluyente (100ml o según el tamaño del contenedor) con el volumen de inóculo adecuado y se homogenizó durante un minuto cada envase de manera que la paredes del contenedor queden impregnadas con el inóculo, luego se eliminó el líquido y dejó secar por 5 minutos.

Para la obtención de la data de la validación secundaria se inocularon 9 frascos con 100 mL de diluyente.

#### **3.6.4. Determinación de la especificidad, sensibilidad y la exactitud relativa de los analistas.**

##### **Ensayos preliminares:**

- Se realizó el ensayo por duplicado en muestras inoculadas, con alguna de las siguientes características:
  - Se realizó la adición del microorganismo objetivo y no objetivo: el microorganismo objetivo fue la *Listeria monocytogenes* con un recuento de 10 a 100 y del microorganismo no objetivo un recuento >1000 UFC.
  - Se usó controles positivos y negativos
- Los resultados preliminares fueron evaluados estadísticamente, usando moda.

Los resultados preliminares fueron satisfactorios y se procedió a seleccionar a los otros analistas que tienen experiencia en métodos con principios similares para que participen en la obtención de la data.

##### **Obtención de la data**

Los 7 analistas designados realizaron el ensayo en el mismo día y para las pruebas bioquímicas de confirmación se seleccionó 5 colonias característica por cada n, completando una data de mínimo 30 resultados y se registró en el formato LE-R-PER.

### 3.6.5. Análisis estadístico

Las muestras inoculadas se repartieron a los analistas de manera aleatoria. Los resultados obtenidos de ambas matrices tanto de las superficies inertes regulares e irregulares fueron sometidos a la Prueba Binomial.

**Sensibilidad.** La evaluación de la sensibilidad fue verificada con la proporción de verdaderos positivos (PVP) mediante la prueba binomial.

$$PVP = \frac{VP}{PE} \times 100$$

PVP = Proporción de verdaderos positivos

VP = Verdaderos positivos

PE = Positivos esperados

El método es sensible cuando se verifique que PVP sea 100%.

**Especificidad.** La especificidad será verificada con la proporción de verdaderos negativos (PVN) mediante la prueba binomial.

$$PVN = \frac{VN}{NE} \times 100$$

PVN = Proporción de verdaderos negativos

VN = Verdaderos negativos

NE = Negativos esperados

El método es específico cuando se verifique que PVN sea 100%.

**Exactitud relativa.** El método será exacto cuando es veraz, es decir, demuestran un alto grado de concordancia con los resultados esperados; y cuando es preciso, es decir, demuestra que los resultados esperados para las muestras inoculadas coinciden entre sí, en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia, y lo mismo ocurre con los resultados esperados de las muestras no inoculadas.

La exactitud relativa será verificada con la proporción de resultados concordantes a los esperados mediante la prueba binomial.

$$ER = \frac{RCVE}{TE} \times 100$$

ER= Exactitud relativa

RCVE = resultados concordantes a los valores esperados

TE = Total de ensayos

El método es exacto cuando verifique que ER sea 100%.

Los análisis se realizaron con el programa estadístico Minitab 17 considerando un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$  (Anexo 11).

**Tabla 6.** Tabla de contingencia para la evaluación estadística de los parámetros cualitativos de la superficie irregular.

Resultados del método	Resultados esperados		Total
	Positivo (Inoculado)	Negativo (No inoculado)	
<b>Positivo ( Detectado )</b>	$N_{11}$	$N_{12}$	$N_{11}+N_{12}$
<b>Negativo ( No detectado)</b>	$N_{21}$	$N_{22}$	$N_{21}+N_{22}$
<b>Total</b>	$N+ = N_{11}+N_{21}$	$N- = N_{12}+ N_{22}$	$N$

**Tabla 7.** Tabla de contingencia para la evaluación estadística de los parámetros cualitativos de la superficie regular.

Resultados del método	Resultados esperados		Total
	Positivo (Inoculado)	Negativo (No inoculado)	
<b>Positivo ( Detectado )</b>	$N_{11}$	$N_{12}$	$N_{11}+N_{12}$
<b>Negativo ( No detectado)</b>	$N_{21}$	$N_{22}$	$N_{21}+N_{22}$
<b>Total</b>	$N+ = N_{11}+N_{21}$	$N- = N_{12}+ N_{22}$	$N$

### 3.7. Elaboración de la documentación de un instructivo sobre el método incidiendo en los procesos operativos no especificados con fines de acreditación de la prueba ante INDECOPI.

Para registrar los detalles del proceso del método Normalizado se elaboró un instructivo, con la finalidad de que al momento del desarrollo de éste, todos los analistas lo apliquen de igual manera y no haya desviaciones (Anexo 13).

#### **IV. RESULTADOS**

**Tabla 8.** Promedio de resultados del control microbiológico ambiental durante los ensayos realizados. Lima-2014.

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA		MICROBIOLOGICO AMBIENTAL	
MICROORGANISMO	SECCION	RESULTADO UFC/15min	x
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de siembra	Mesa 1	4
MOHOS Y LEVADURAS			3
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de siembra	Mesa 2	3
MOHOS Y LEVADURAS			3
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de siembra	Mesa 3	4
MOHOS Y LEVADURAS			2
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de siembra	Mesa 4	5
MOHOS Y LEVADURAS			3
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de siembra	Mesa 5	4
MOHOS Y LEVADURAS			3
AEROBIOS MESOFILOS		Cabina de flujo laminar	0
MOHOS Y LEVADURAS			0
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de pases	Mesa 1	4
MOHOS Y LEVADURAS			3
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de pases	Mesa 2	4
MOHOS Y LEVADURAS			4
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de preparación de medios de cultivo		3
MOHOS Y LEVADURAS			2

**Tabla 9.** Temperaturas de trabajo establecidos en los equipos. Lima-2014.

**AREA: MICROBIOLOGIA**

EQUIPO: INCUBADORA		CODIGO: 1210	
<b>CODIGO: 2516</b>			
<b>N° CERTIFICADO:</b> TC-0425-2014	<b>N° CERTIFICADO:</b> TC-0431-2014	<b>N° CERTIFICADO:</b> T-1978-2012	
<b>PARAMETRO:</b> TEMPERATURA °C	<b>PARAMETRO:</b> TEMPERATURA °C	<b>PARAMETRO:</b> TEMPERATURA °C	
<b>VO</b>	<b>VCV</b>	<b>VO</b>	<b>VCV</b>
23,6	25,4	37,3	36,6
		29	30,3
23,7	25,4		

**Tabla 10.** Evaluación de la productividad y selectividad de medios de cultivo líquidos de enriquecimiento selectivo (caldo Fraser). Lima-2014

Medio / N° Lote / Fecha de Lectura	TEMPER ATURA °C	METODO DE CONTROL	TIEMP O	CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO				
				Función	Cepa Contr ol	Reacción característica del microorganismo	Criterio	
							Confo rme	No confo rme
Caldo fraser, N° Lt 587 FL: 13-10-23 Enriquecimiento primario	30 ± 1°C	Semi- cuantitativo	24±3h	Productivi dad	ML 3	M.O: >10 colonias en agar ALOA, colonias verde - azules rodeadas de un halo opaco.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Agar ALOA, N° Lote: 615 Agar PALCAM, N° Lote: 616 FL: 13-10-25	37 ± 1°C		24-48h			M.O: >10 colonias en agar PALCAM, colonias verde grisáceo o verde oliva con una depresión central rodeadas de un halo negro.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Agar TSA, N° Lote: 623 FL: 13-10-24			24 ± 3 h	Selectivid ad	ML 27	M.N.O.: Inhibición total en TSA	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Caldo Fraser, N° Lote: 587 FL: 13-10-25 Enriquecimiento secundario	37 ± 1°C	Semi- cuantitativo	48±2h	Productivi dad	ML 03	M.O: >10 colonias en agar ALOA, colonias verde - azules rodeadas de un halo opaco.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Agar ALOA, N° Lote: 615 Agar PALCAM, N° Lote: 616 FL: 13-10-27 Agar TSA, N° Lote: 623 FL: 13-10-26			24-48h			M.O: >10 colonias en agar PALCAM, colonias verde grisáceo o verde oliva con una depresión central rodeadas de un halo negro.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
			24 ± 3 h	Selectivid ad	ML 27	M.N.O.: Inhibición total en TSA	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Tabla 11.** Evaluación de la productividad y selectividad de medios de cultivo selectivo sólidos (agar ALOA). Lima 2014.

Medio / N° Lote / Fecha de Lectura	TEMPERA TURA °C	METODO DE CONTROL	TIEMP O	Función	Cepa	Reacción característica del microorganismo	Criterio	
TSA N° Lote: 623	37 ± 1°C	Cuantitativo	24-48h	Productiv	ML 03	Ns=110 No= 145	PR esperado ≥ 0,5 PR obtenido = 0,76	
				idad				Confo rme rme
Agar ALOA, N° Lote: 615 FL:: 13-10-25		Cualitativo		Especifici	ML 14	M.O: Colonias verde - azules rodeadas de un halo opaco	✓	
				dad		M.O: colonias verde - azules sin halo opaco	✓	
				Selectivid	ML 27	M.N.O: Total inhibición	✓	
				ad			ad	✓

**Tabla 12.** Evaluación de la productividad y selectividad de medios de cultivo selectivo sólidos (agar PALCAM). Lima 2014.

Medio / N° Lote / Fecha de Lectura	TEMPERA TURA	METODO DE	TIEMPO	CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO				
°C	CONTROL			Función	Cepa	Reacción característica del microorganismo	Criterio	
				n	Control		Confor me No confo rme	
TSA N° Lote: 623	37 ± 1°C	Cuantitativo	24-48h	Producti vidad	ML 03	Ns= 105 No= 135	PR esperado ≥ 0,5 PR obtenido = 0,78	✓
Agar PALCAM, N° Lote: 616 FL:13-10-25		Cualitativo		Selectivi dad	ML 27	M.O: Colonias verde grisáceo o verde oliva con una depresión central rodeadas de un halo negro. M.N.O: Total inhibición		✓

**Tabla 13.** Evaluación de la productividad y selectividad de medios de cultivo no selectivo sólido y líquido (agar TSAYE y caldo TSBYE).  
Lima 2014.

Medio / N° Lote /	TEMPER	METODO	TIEMP	CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO			
Fecha de Lectura	ATURA	DE	O	Función	Cepa	Reacción característica	Criterio
	°C	CONTROL					
Agar TSAYE, N° Lote: 658 FL: 13-10-26	37 ± 1°C	Cualitativo	18-24h	Productivi dad	ML 03	M.O.: buen crecimiento (puntaje: 2)	Conf No orme confor me
Caldo TSBYE, N° Lote: 705 FL: 13-10-26	25 ± 1°C	Cualitativo	8-24h	Productivi dad	ML 03	M.O.: buen crecimiento (puntaje: 2)	✓



**Tabla 15.** Tabla de contingencia de los resultados experimentales de las muestras inoculadas de las superficies inertes irregulares. Lima 2014.

Resultados del método	Resultados esperados		Total
	Positivo (Inoculado)	Negativo (No inoculado)	
<b>Positivo ( Detectado )</b>	23	0	23
<b>Negativo ( No detectado )</b>	0	12	12
<b>Total</b>	23	12	35

**Tabla 16.** Determinación de los parámetros cualitativos de las superficies inertes irregulares. Lima 2014.

	Verdaderos positivos ( $N_{11}$ )	23
	Positivos esperados ( $N_+$ )	23
<b>SENSIBILIDAD (%)</b>	Proporción de verdaderos positivos (PVP) = $N_{11} / N_+$	100%
	Verdaderos negativos ( $N_{22}$ )	12
	Negativos esperados ( $N_-$ )	12
<b>ESPECIFICIDAD (%)</b>	Proporción de verdaderos negativos (PVN) = $N_{22} / N_-$	100%
	Resultados concordantes a los valores esperados ( $N_{11} + N_{22}$ )	35
	Total de ensayos (N)	35
<b>EXACTITUD (%)</b>	Exactitud relativa (ER) = $(N_{11} + N_{22}) / N$	100%

**Tabla 17.** Tabla de contingencia de los resultados experimentales de las muestras inoculadas de las superficies inertes regulares. Lima 2014.

		Resultados esperados		Total
		Positivo (Inoculado)	Negativo (No inoculado)	
Resultados del método				
Positivo ( Detectado )		21	0	21
Negativo ( No detectado )		0	14	14
Total		21	14	35

**Tabla 18.** Determinación de los parámetros cualitativos de las superficies inertes regulares. Lima 2014.

	Verdaderos positivos ( $N_{11}$ )	21
	Positivos esperados (N+)	21
<b>SENSIBILIDAD (%)</b>	Proporción de verdaderos positivos (PVP) = $N_{11} / N_{1+}$	100%
	Verdaderos negativos ( $N_{22}$ )	14
	Negativos esperados (N-)	14
<b>ESPECIFICIDAD (%)</b>	Proporción de verdaderos negativos (PVN) = $N_{22} / N_{2-}$	100%
	Resultados concordantes a los valores esperados ( $N_{11} + N_{22}$ )	35
	Total de ensayos (N)	35
<b>EXACTITUD (%)</b>	Exactitud relativa (ER) = $(N_{11} + N_{22}) / N$	100%

## V. DISCUSIÓN

Durante todo el proceso experimental de la validación secundaria, los resultados del control microbiológico ambiental se encontraron dentro de los límites microbiológicos permisibles para el ambiente ya que en el agar Plate Count el crecimiento de bacterias aerobias mesófilas fueron  $\leq 15$  UFC/placa, lo mismo ocurrió en el agar Oxitetraciclina glucosa extracto de levadura, donde el crecimiento de mohos y levaduras fueron  $\leq 15$  UFC/placa (Tabla 8) (Anexo 5) lo que asegura que las condiciones de trabajo fueron óptimas siendo primordial estos resultados para la obtención de resultados confiables durante el proceso de validación.

El laboratorio debe asegurarse de que las condiciones ambientales no invaliden los resultados ni comprometan la calidad requerida de las mediciones.

El laboratorio debe realizar el seguimiento, controlar y registrar las condiciones ambientales según lo requieren las especificaciones, métodos y procedimientos correspondientes, o cuando éstas puedan influir en la calidad de los resultados. Se debe prestar especial atención, por ejemplo, a la esterilidad biológica, el polvo, la interferencia electromagnética, la radiación, la humedad, el suministro eléctrico, la temperatura, y a los niveles de ruido y vibración, en función a las actividades técnicas en cuestión. Cuando las condiciones ambientales comprometan los resultados de los ensayos o de las calibraciones, éstos se deben interrumpir.<sup>29</sup>

La verificación de las temperaturas, de las fechas de calibración de los equipos de trabajo es de suma importancia se evidenció que los equipos de trabajo utilizados en la etapa experimental de la validación secundaria cumplen con las temperaturas establecidas en el método y se evidenció que los certificados de

calibración se encontraban vigentes por lo tanto se puede asegurar que los equipos utilizados funcionan de acuerdo con sus especificaciones operacionales establecidas (Tabla 9) (Anexo 6) (Anexo 7).

La verificación de la calibración instrumental, es un aspecto importante a realizar antes de la verificación secundaria o validación. Cada instrumento es calibrado por personal competente en un laboratorio nacional o metrología o por personal especialista del proveedor o fabricante. En cualquiera de los casos, se extiende un certificado de calibración con las especificaciones técnicas correspondientes.<sup>29</sup>

La verificación del control y registro de la temperatura y humedad ambiental de las áreas de trabajo se encontraron dentro de los rangos establecidos, por consiguiente se puede decir que las condiciones ambientales son óptimas durante el proceso experimental de la validación secundaria (Anexo 8).

El control de calidad en la preparación y evaluación de los medios de cultivo es considerado como parte esencial de las buenas prácticas de laboratorio, el cual es necesario para mantener el nivel y la ejecución de cualquier técnica microbiológica, siendo este un proceso continuo que se extiende desde las materias primas, hasta el producto final utilizado, el cual es evaluado directamente por el laboratorio que emplea en medio de cultivo para su análisis. Por esta razón, se le confiere una gran importancia y está considerado como uno de los puntos críticos de control de análisis microbiológico, del cual depende de la seguridad de los resultados que emiten los laboratorios de ensayo.<sup>30</sup>

La productividad hace referencia a la formulación básica de medio, de tal forma que favorezca el crecimiento de microorganismos con las características macroscópicas y microscópicas esperadas. La productividad es una variable de especial interés cuando se trabaja en el desarrollo de producción de nuevos medios, ya que siempre se espera que los aportes nutricionales sean equilibrados para obtener el crecimiento y la producción de los metabolitos de interés, la selectividad hace referencia a la formulación del medio con respecto a su capacidad de eliminar o excluir microorganismos acompañantes e indeseables que puedan de un modo u otro interferir en el crecimiento de los microorganismos objeto de análisis.<sup>30</sup>

Se realizó un examen visual a todos los medios de cultivo preparados para poder descartar cualquier error, se observó el color, consistencia y aspecto como indican en la ficha técnica de éstos.

Se determinó la selectividad y productividad de los medios de cultivo, la productividad para el caldo Fraser (enriquecimiento primario y enriquecimiento secundario) es satisfactoria debido a que el crecimiento del microorganismo objetivo fue >10 colonias en agar ALOA y PALCAM, la selectividad también fue satisfactoria ya que no existe crecimiento del microorganismo no objetivo en agar no selectivo (TSA) (Tabla 10), esto se debe el caldo Fraser contiene suplementos selectivos que una mezcla de acriflavine, ácido nadilixico, que inhiben el crecimiento bacteria GRAM negativa y flora acompañante, de cloruro de litio que inhibe el desarrollo de enterococos y la inclusión de citrato de amonio férrico (Fraser suplemento) que favorece el desarrollo de *Listeria*, todas las especies de *Listeria* hidrolizan la esculina dando la formación de 6,7-dihidroxicumarina (esculetina) que reacciona con los iones férricos que detectaran la reacción formando un complejo marrón oscuro a negro<sup>31</sup>.

La tasa de productividad del agar ALOA fue de 0.76 por lo tanto es satisfactoria ya que la tasa de productividad esperada es  $\geq 0.5$ , las colonias de *Listeria monocytogenes* fueron colonias verde-azules rodeadas de un halo opaco, la selectividad fue satisfactoria porque hubo inhibición total del microorganismo no objetivo (Tabla 11), es decir que no hubo crecimiento del microorganismo no objetivo debido a que el agar es selectivo, los resultados satisfactorios que se obtuvieron fue debido a que el agar ALOA es una agar selectivo cromogénico que incorpora en su composición de inhibidores del crecimiento de la mayoría de microorganismos GRAM positivas y GRAM negativo patógenos así como levaduras y hongos, la adición de dos sustratos realza la potencia, el sustrato cromogénico detecta la enzima  $\beta$ -glucosidasa, común en todas las especies de *Listeria* virando sus colonias a color azul-verdes, y el sustrato L- $\alpha$ -phosphatidylinositol que se añade al medio para detectar *Listeria monocytogenes* ya que este microorganismo tiene la enzima phosphatidylinositol phosphoolipase C (PI-PLC), que es el factor de virulencia del microorganismo, la actividad de la fosfolipasa se traduce en la formación de un halo opaco alrededor de las colonias, de esta manera se puede diferenciar de las otras listerias<sup>32</sup>.

La tasa de productividad del agar PALCAM fue de 0.78 por lo tanto es satisfactoria ya que la tasa de productividad esperada es  $\geq 0.5$ , las colonias de *Listeria monocytogenes* fueron colonias verde grisáceo o verde oliva con una depresión central rodeadas de un halo negro, la selectividad fue satisfactoria porque hubo inhibición total del microorganismo no objetivo (Tabla 12).

La selectividad del medio es por la presencia inhibidores que suprimen el crecimiento de la mayoría de la flora acompañante, el agar PALCAM presenta esculina y manitol, la fermentación del manitol se demuestra por un cambio de color del medio de rojo a amarillo debido a la producción de ácidos, *Listeria* hidroliza la esculina formando así esculetina y reacciona con los iones férricos hasta producir un complejo marrón a negro, de esta manera se identifica a las *Listerias*<sup>33</sup>.

La Productividad del agar y del caldo Soya tripticasa + extracto de levadura fue satisfactoria y la puntuación asignada fue 2 debido al buen crecimiento del microorganismo objetivo (Tabla 13).

Para la obtención de la data, primero se realizó la determinación de concentración del inóculo por tres repeticiones del microorganismo objetivo como del microorganismo no objetivo que es importante conocer la concentración para contaminar las matrices una determinada concentración (Tabla 14) (Anexo 9), como también se realizó pruebas preliminares para observar el comportamiento de las matrices y de los medios de cultivo, los analistas participantes realizaron el ensayo el mismo día y las para las pruebas bioquímicas se seleccionó cinco colonias presuntivas.

Se aplicó pruebas estadísticas a los resultados preliminares para las superficies regulares como para las irregulares, en las superficies regulares se analizaron dos muestras inoculadas (superficies planas) con *Listeria monocytogenes* por duplicado y se compararon los resultados esperados con los obtenidos experimentalmente, el estadístico que se utilizó es la moda; los resultados fueron repetibles y concordantes a los esperados. En las superficies irregulares se analizaron tres tipos de muestras inoculadas (cucharas, tapers, vasos) con *Listeria monocytogenes* por duplicado y se compararon los resultados esperados con los obtenidos experimentalmente, el estadístico que se utilizó es la moda, los resultados fueron repetibles y concordantes a los esperados (Anexo 10).

Se evaluaron los parámetros cualitativos como: Precisión, selectividad, sensibilidad y veracidad. En la obtención de la data participaron 7 analistas, para las superficies inertes regulares e irregulares los 35 resultados obtenidos por cada matriz (Anexo 11).

La Tabla 15 muestra los resultados experimentales y esperados de las muestras inoculadas de las superficies inertes irregulares, se obtuvieron 35 resultados donde 23 muestras se inocularon y las 23 muestras dieron como resultado

positivo y 12 muestras no se inocularon, esas 12 muestras dieron como resultado negativo por los analistas participantes.

La Tabla 17 muestra los resultados experimentales y esperados de las muestras inoculadas de las superficies inerte regulares, se obtuvieron 35 resultados donde 21 muestras se inocularon y las 21 muestras dieron como resultado positivo y 14 muestras no se inocularon, esas 14 muestras dieron como resultado negativo por los analistas participantes.

La Tabla 16 y Tabla 18 muestran los parámetros cualitativos evaluados del método, la Sensibilidad para superficies inertes irregulares y regulares fue verificada con la proporción de verdaderos positivos, el método es sensible porque se verificó al 95% de confianza que la proporción de verdaderos positivos recuperados es del 100%, es decir, que el método es capaz de detectar al microorganismo objetivo cuando la muestra sí contiene al microorganismo objetivo.

La especificidad para superficies inertes irregulares y regulares fue verificada con la proporción de verdaderos negativos, el método es específico porque se verificó al 95% de confianza que la proporción de verdaderos negativos recuperados es del 100%, es decir, que el método tiene la capacidad de dar como negativo cuando la muestra no contiene al microorganismo objetivo.

La exactitud relativa (ER) para superficies inertes irregulares y regulares se demuestra cuando el método es veraz y preciso, el método es exacto porque se verificó al 95% de confianza que la exactitud relativa es el 100%, es decir el método es exacto cuando es veraz la veracidad se demostró porque existe concordancia de los resultados esperados, y es preciso porque el método demostró que los resultados esperados de las muestras inoculadas coincidieron entre sí, en condiciones de repetibilidad, y lo mismo ocurrió con los resultados esperados de las muestras no inoculadas.

La obtención de los resultados de todos estos parámetros garantiza que el laboratorio haciendo uso de este método emita resultados confiables y de calidad.



## VI. CONCLUSIONES

- El método "ISO 11290 - 1:1996/Amd 1:2004 Microbiología de los alimentos y piensos método horizontal para la detección y enumeración de *Listeria monocytogenes*", en hisopados de superficie inerte que ingresan a la empresa Certificaciones del Perú, S.A., logró su validación secundaria ya que cumplió con todos los parámetros evaluados.
- El monitoreo de las condiciones microbiológicas ambientales de trabajo se encontraron dentro de los límites microbiológicos permisibles, ya que bacterias aerobias mesófilas y mohos y levaduras fueron  $\leq 15$  UFC/placa, la temperatura y humedad ambiental de trabajo se encontraron dentro de los límites establecidos, la temperatura de las incubadoras se mantuvieron dentro de lo establecido.
- La efectividad del caldo Fraser (enriquecimiento primario y enriquecimiento secundario) es satisfactoria, ya que el crecimiento del microorganismo objetivo fue  $>10$  colonias en agar ALOA y PALCAM, la selectividad también fue satisfactoria ya que no existe crecimiento del microorganismo no objetivo en agar no selectivo (TSA), la tasa de productividad del agar ALOA fue de 0.76 y del agar PALCAM fue de 0.78 por lo tanto es satisfactoria, la selectividad del agar ALOA y PALCAM también fueron satisfactorias porque hubo inhibición total del microorganismo no objetivo.

- Los parámetros evaluados para superficies inertes irregulares y regulares como la sensibilidad, la especificidad y la exactitud relativa del método se verificó al 95% que el método es sensible, específico y exacto.
- Los procesos operativos no especificados en el método con fines de acreditación de la prueba ante INDECOPI se detalló en un instructivo.

## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Se recomienda que al iniciar una validación secundaria de un método trabajar de manera adecuada, respetando los tiempos de incubación de todas las cepas que indica el método.
2. Se recomienda validar este método 11290 - 1:1996/Amd 1:2004 para el análisis microbiológico de otras matrices.
3. Hacer uso de métodos validados complementarios como análisis molecular, permitiendo de esta manera obtener mayor confiabilidad en los resultados obtenidos.
4. Se recomienda revisar periódicamente las actualizaciones del método, para verificar los posibles cambios con el tiempo.

**VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Delgado Gómez G. Validación y Verificación de métodos de ensayo. Un Dilema en los laboratorios de ensayos y en las auditorias de acreditación [Universitas] 2009 [Consultado el 7 de agosto del 2013]; 3 (2). Disponible en: [http://universitas.unanleon.edu.ni/pdf/volumen3n2/Arto2\\_universitas\\_nov2009.pdf](http://universitas.unanleon.edu.ni/pdf/volumen3n2/Arto2_universitas_nov2009.pdf)
2. Juran Jurado M, Bingham RS, Gryna FM. Manual de Control de la Calidad. 2ª ed. Barcelona:Reverté; 2005.
3. Aldana de Vega L, Vargas Quiñones, ME. Calidad y servicio: conceptos y herramientas. 1ª ed. Bogotá: Ecoe; 2007.
4. Udaondo Durán, M. Gestión de Calidad, 2ª ed. Madrid: Díaz de Santos; 1992.
5. Nava Carbellido, VM, ¿Qué es la calidad? Conceptos, gurús y modelos fundamentales, 1ª ed. México: Limusa; 2005.
6. United States Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia XXXVI. Rockville: Baltimore; 2012.
7. Calidad del agua. Guía para la orientación acerca de la validación de métodos de análisis microbiológicos. Decreto 2269 del 26 de febrero. Boletín Oficial del Estado, n°576, (27-02-2003).
8. International Organization for Standardization, ISO 9000:2000, Sistemas de gestión de la calidad: Génova: 2000.
9. Padilla Gonzalez, JE. Validación secundaria del método de recuento en placa en superficie de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* en muestras de alimentos en un laboratorio de referencia [Tesis de Grado]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana [Tesis en línea, consultado el 23 de setiembre 2014]. Disponible en: <http://www.pda.org/pdf/Anx%2015%20PDA%20Coments%20Final.pdf>
10. Oficina Guatemalteca de Acreditación (OGA). Política de Selección y Validación de Métodos de Ensayo [Revista internet] 2007 [consultado 25 de agosto del 2014] 12(2). Disponible en: <http://oga.org.gt/images/files/File/OGA-GEC-016.pdf>
11. Ortiz Gómez, DS. Validación e implementación de una metodología para el análisis microbiológico de un producto líquido preservado elaborado en una industria farmacéutica [Tesis de Grado] Bogotá: Pontificia Universidad

- Javeriana [Tesis en línea, consultado el 23 de setiembre 2014]. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis109.pdf>
12. Organización Internacional de la Viña y el Vino OENO. Recomendaciones armonizadas para la validación de métodos de análisis en un solo laboratorio. Paris: 2005 [Consultado el 27 de agosto del 2014]. Disponible en: <file:///C:/Users/Tosh/Downloads/OENO%208-2005%20ES.pdf>.
  13. International Organization for Standardization, ISO 11290-1:1996 Microbiología de los alimentos para el consumo humano y para los animales. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*: Génova: 2000.
  14. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Sistema de Gestión de la Calidad. Fundamentos y Vocabulario. Colombia: 2005 [Consultado el 18 de noviembre del 2013]. Disponible en: [http://www.uco.es/sae/archivo/normativa/ISO\\_9000\\_2005.pdf](http://www.uco.es/sae/archivo/normativa/ISO_9000_2005.pdf)
  15. World Health Organization, Quality assurance of pharmaceuticals. A Compendium of guidelines and related materials. Madrid: 2007. [Consultado el 19 de mayo del 2014]. Disponible en: <http://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=59s4hlhFKowC&oi=fnd&pg=PA1&dq=15.+WHO,+Quality+assurance+of+pharmaceuticals.+Good+manufacturing+practices+and+inspection&ots=RWTazGsbNY&sig=ejPPc0p68gyl-HeVYiaLSaSSeNQ#v=onepage&q=15.%20WHO%2C%20Quality%20assurance%20of%20pharmaceuticals.%20Good%20manufacturing%20practices%20and%20inspection&f=false>
  16. Lucena Gómez C, Cruz Gómez JC, Méndez MA, Cáceres Clavero F. Sistemas de certificación de la calidad en el sector agroalimentario español. Distribución y consumo. Revista Interciencia [Revista en línea]. 2008 [Consultado el 8 de marzo del 2014]; 32(3). Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=s037818442008000400006&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=s037818442008000400006&script=sci_arttext)
  17. Reij Russell, MV y Den A. Recontamination as a surface of pathogens in processed foods. Revista Food Microbiology [Revista en línea]. 2004 [Consultado el 17 de marzo 2014]; 25 (5) Disponible en: [file:///C:/Users/Tosh/Downloads/2004recon\\_sour.pdf](file:///C:/Users/Tosh/Downloads/2004recon_sour.pdf)

18. García Diago C. Revisión y actualización de los procedimientos documentados del laboratorio de microbiología de alimentos de la Pontificia Universidad Javeriana y elaboración de manual de manejo de equipos [Tesis de grado]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, departamento de microbiología industrial, 2006. [Tesis en línea, consultado el 10 de junio del 2014]. Disponible en:  
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis269.pdf>
19. Hayes Hurtado, P.R., Microbiología e Higiene de los Alimentos. 2da Ed. Zaragoza: Acribia: 1993.
20. Soler León, J.P. Validación secundaria del método de número más probable y recuento en placa profunda para coliformes totales y termotolerantes en muestras de ensalada y arroz cocido basada en la norma ISO NTC 17025. [Tesis de grado]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, departamento de Microbiología, 2006. [Tesis en línea, consultado el 18 de junio del 2014]. Disponible en:  
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis273.pdf>
21. ICMSF Microorganismos in Foods Microbiological Specifications of Food Pathogens. Blackie Academic & Professional. Zaragoza: Acribia; 2000.
22. Burn Wayne, C. G. Clinical and pathological features of an infection caused by a new pathogen of the genus *Listerella*. Revista Pathology [Revista en línea]. 2006 [Consultado el 23 de Julio del 2014]; 22(4). Disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1911083/>
23. William y wilkins. Manual of Determinative Bacteriology. Regular, nonsporing gram-positive rods. 9ª ed. Baltimore: Bergey's; 1996.
24. Schlech Rocourt F, Lavigne Reilly M, Bortolussi Skank R, Allen Elliot C, Haldane Losikoff V, Wort Gitter J. Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. Revista UDCA [Revista en línea]. 2005 [Consultado el 05 de agosto del 2014]; 123(3). Disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6401354?report=docsum>
25. Torres Córdoba KJ, Sierra Landázuri C, Poutou Piñales RA, Vera Echeverri H, Carrascal Barrera AK, Mercado M. Incidencia y diagnóstico de *Listeria monocytogenes*; microorganismo zoonótico emergente en la industria de alimentos. Revista UDCA [Revista en línea]. 2005 [Consultado el 12 de febrero del 2014]; 325(12). Disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372831/>

26. Farber Junkins, JM. 2000. *Listeria monocytogenes* and Ready-to-eat Seafood Products. Revista Food Microbiology [Revista en línea]. 2012 [Consultado el 14 de Julio del 2014]; 10(3). Disponible en:  
<http://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2012/497635/>
27. ISO International Organization for Standardization, 17025:2006. Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de ensayo y calibración: Génova: 2000.
28. Delgado García G. Validación y Verificación de métodos de ensayo. Un Dilema en los laboratorios de ensayos y en las auditorias de acreditación [Universitas] 2009 [Consultado el 7 de agosto del 2013]; 3 (2). Disponible en:  
[http://universitas.unanleon.edu.ni/pdf/volumen3n2/Arto2\\_universitas\\_nov2009.pdf](http://universitas.unanleon.edu.ni/pdf/volumen3n2/Arto2_universitas_nov2009.pdf)
29. Soler León, J.P. Validación secundaria del método de número más probable y recuento en placa profunda para coliformes totales y termotolerantes en muestras de ensalada y arroz cocido basada en la norma ISO NTC 17025. [Tesis de grado]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, departamento de Microbiología, 2006. [Tesis en línea, consultado el 26 de agosto del 2014]. Disponible en:  
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis273.pdf>
30. Paez Sanabria, S.J. Validación secundaria del método de filtración por membrana para la detección de coliformes totales y *Escherichia coli* en muestras de aguas para consumo humano analizadas en el laboratorio de salud pública del Huila. [Tesis de grado]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, departamento de Microbiología Industrial, 2008. [Tesis en línea, consultado el 26 de agosto del 2014]. Disponible en:  
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis221.pdf>
31. Oxoid.com [internet]. Medios de cultivo deshidratados, Fraser Broth Base [Internet]. Gran Bretaña: Oxoid.com; 2001-[Actualizada el 11 de noviembre del 2011]. Disponible en:  
[http://www.oxoid.com/uk/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0895&org=91&c=uk&lang=EN](http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0895&org=91&c=uk&lang=EN)
32. Biolife Italiana. ALOA , Agar Listeria to Otaviani-Agosti, enrichment –selective supplements. Milan: Biolife Italiana; 2005.  
Disponible en:  
<http://www.biolifeitalianaTS-401605-ALOA>

33. Oxoid.com [internet]. Medios de cultivo deshidratados, PALCAM [Internet]. Gran Bretaña: Oxoid.com; 2001-[Actualizada el 16 de noviembre del 2011]. Disponible en:  
[http://www.oxoid.com/uk/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0899&org=91&c=uk&lang=EN](http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0899&org=91&c=uk&lang=EN)

## **ANEXOS**

**Anexo 1.** Método ISO 11290-1:1996 microbiología de los alimentos y piensos  
método horizontal para la detección y enumeración de *Listeria monocytogenes*

**INTERNATIONAL  
STANDARD**

**ISO  
11290-1**

First edition  
1996-12-15

---

**Microbiology of food and animal feeding  
stuffs — Horizontal method for the  
detection and enumeration of *Listeria  
monocytogenes* —**

**Part 1:  
Detection method**

*Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche et le  
dénombrement de *Listeria monocytogenes* —*

*Partie 1: Méthode de recherche*



Reference number  
ISO 11290-1:1996(E)

## **Microbiología de los alimentos y piensos - Método horizontal para la detección y enumeración de *Listeria monocytogenes*.**

### **Introducción**

ISO (Organización Internacional de Estandarización) es una federación mundial de organismos nacionales de normalización. El trabajo de preparación de estándares internacional normalmente realizado a través de los comités técnicos. Cada organismo miembro interesado en una materia para la cual se haya establecido un comité técnico, tiene el derecho de estar representado en dicho comité. Organizaciones internacionales, gubernamentales y no gubernamentales en colaboración con también participan en el trabajo colabora estrechamente con la Comisión Electrotécnica Internacional en todas las cuestiones de electrotécnica.

**Advertencia:** a fin de salvaguardar la salud del personal de laboratorio, se recomienda que las pruebas de detección de *Listeria monocytogenes* se llevan a cabo en laboratorios debidamente equipados, bajo el control de un microbiólogo experto, y que tiene mucho cuidado en la eliminación de todos los materiales incubados. en particular, se recomienda que el personal de embarazadas no manipulan los cultivos de *L. monocytogenes*.

### **Alcance**

Esta parte de la norma ISO 11290 especifica un método horizontal para la detección de *Listeria monocytogenes*

Sujeto a las limitaciones a la introducción esta parte de la ISO 11290 es aplicable a los productos destinados al consumo humano o la alimentación animal

### **Referencias normativas**

Las siguientes normas contienen disposiciones que, mediante su referencia en este texto, constituyen disposiciones de esta parte de la norma ISO 11290. En el momento de la publicación, las ediciones indicadas eran válidas. Todas las normas están sujetas a revisión y los participantes, mediante acuerdos basados en esta parte de la ISO 11290 para investigar la posibilidad de aplicar las ediciones más recientes de los estándares indicados a continuación. Los miembros de IEC y ISO mantienen registros de normas internacionales vigentes en el momento actual.

### **3 Definición**

A los efectos de esta parte de la norma ISO 11290, se aplican las siguientes definiciones:

#### **3.1 *Listeria monocytogenes***

Microorganismos que forman colonias típicas en medios selectivos sólidos que muestran una de las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas descritas cuando las pruebas se llevan a cabo en un poco con arreglo a esta parte de la norma ISO 11290

#### **3.2 DETECCIÓN DE *Listeria monocytogenes***

Determinación de la presencia o ausencia de estos microorganismos, en una masa o volumen de producto determinado, cuando las pruebas se llevan a cabo de acuerdo con esta parte de la norma ISO 11290

### **4 PRINCIPIO**

Dentro de los límites de esta parte de la ISO 11290, la detección de *L. monocytogenes* requiere cuatro etapas sucesivas (véase el anexo A para un diagrama de flujo)

Nota: *Listeria* spp. Pueden estar presentes en pequeñas cantidades y, a menudo van acompañadas de números considerablemente más grandes de otros géneros, por lo tanto, es necesario, el enriquecimiento selectivo. También es necesario para detectar *Listeria* spp dañados. Y el medio de enriquecimiento primario selectivo, con una reducción de la concentración del inhibidor, cumple al menos parte de esta función.

#### **4.1 Enriquecimiento primario en un medio líquido de enriquecimiento selectivo con reducida concentración de agentes selectivos (medio caldo Fraser)**

La inoculación de un medio de enriquecimiento selectivo primaria que contiene un volumen de cloruro de litio y la mitad de un volumen de acriflavina y ácido nalidixico (medio caldo Fraser), que también se utiliza como un líquido de dilución para la muestra de ensayo (9.1)

La incubación de la muestra de ensayo a 30 ° C durante 24 h

#### **4.2 Enriquecimiento secundario con un medio líquido de enriquecimiento selectivo con alta concentración de agentes selectivos (caldo Fraser)**

La inoculación con el medio líquido secundario de enriquecimiento repotenciado (caldo Fraser) con un cultivo obtenido de 4.1

La incubación del caldo Fraser a 35 ° C o 37 ° C durante 48 h

#### **4.3 Siembra e identificación**

A partir de los cultivos obtenidos en 4.1 y en 4.2 sembrar en los dos medios sólidos selectivos:

- a) Oxford agar
- b) PALCAM agar

La incubación a 30 ° C, 35 ° C o 37 ° C y la observación después de 24 h y, si es necesario, después de 48 h para observar la presencia de colonias características que son presuntivas de *L. monocytogenes*

#### 4.4 Confirmación

Subcultivar las colonias presuntivas de *L. monocytogenes*, sembrar como se describe en 4.3 y la confirmación mediante pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas adecuadas.

### 5 medios de cultivo y reactivos

#### 5.1 Generalidades

Para las prácticas actuales de laboratorio, véase la norma ISO 7218.

NOTA 2 Debido al gran número de medios de cultivo y reactivos, se ha considerado preferible, para mayor claridad del texto, para dar su composición y preparación en el anexo B

#### 5.2 Medio de enriquecimiento primario selectivo: caldo Fraser con una reducción concentración de agentes selectivos (medio caldo Fraser)

Véase la cláusula B.1

#### 5.3 medio de enriquecimiento secundario selectivo, con alta concentración de agentes selectivos (caldo Fraser)

Véase la cláusula B.2

#### 5.4 Siembra de medios selectivos sólidos

##### 5.4.1 primer medio: agar Oxford

Véase la cláusula B.5.

##### 5.4.2 En segundo medio: Agar PALCAM

Véase la cláusula B.4

##### 5.5 Medio de cultivo Sólido: triptona de soja agar extracto de levadura (TSYEA)

Véase la cláusula B.5

##### 5.6 Medio de cultivo Líquido: Triptone soja caldo de extracto de levadura (TSYEB)

Véase la cláusula B.6

##### 5.7 Agar sangre de oveja

Véase la cláusula B.7

##### 5.8 Caldo de utilización para Carbohidratos (ramnosa y la xilosa)

Véase la cláusula B.8

##### 5.9 Agar de motilidad (opcional)

Véase la cláusula B.9

##### 5.10 CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen) medio y cepas de prueba

Véase la cláusula B.10

##### 5.11 Solución de peróxido de hidrógeno

Véase la cláusula B.11

### 6 Aparatos y materiales de vidrio

Equipos microbiológicos usuales (Ver ISO 7218) y en particular lo siguiente.

#### 6.1 Aparato para la esterilización en seco (horno) o húmedo (autoclave)

Ver ISO 7218

#### 6.2 Estufa o incubadoras, capaz de ser mantenida entre 25°C y 50°C ± 1°C

#### 6.3 Incubadoras, para mantener el medio inoculado, placas y tubos con los siguientes rangos de temperaturas:

a) 25°C ± 1°C

b) 30°C ± 1°C

c) 35°C ± 1°C o 37°C ± 1°C

#### 6.4 baños de agua, capaz de ser mantenida entre 47°C ± 2°C

#### 6.5 Asas de inoculación, de platino o iridio aproximadamente 3mm de diámetro.

#### 6.6 pH-metro, capaz de leer más cerca de 0.01 pH a 25°C.

#### 6.7 Tubos de prueba o frascos, de capacidad apropiada, para esterilización y almacenamiento e incubación de medios de cultivos líquidos.

#### 6.9 Pipetas graduadas, de capacidades nominales 10mL y 1mL, graduadas respectivamente en 0.5mL y 0.1mL.

#### 6.10 Placa de Petri, de diámetro 90mm a 100mm.

### 7 Toma de Muestras

Es importante que el laboratorio reciba una muestra que sea verdaderamente representativa y que no ha sido alterada ni cambiada durante su transporte o almacenamiento

El muestreo no es parte del método específico en esta parte de la norma ISO 11290. Si no existe una norma internacional específica frente a muestreo del producto en cuestión, se recomienda que las partes interesadas lleguen a un acuerdo sobre este tema

## **8 Preparación de la muestra problema**

Preparar la muestra de ensayo en conformidad con la norma internacional específica adecuada al producto en cuestión. Si no existe una norma internacional específica, se recomienda que las partes interesadas lleguen a un acuerdo en este tema

## **9 Procedimiento**

### **9.1 Tamaño de la muestra y Suspensión inicial**

Véase la Norma ISO 6887 y cualquier norma internacional específica adecuada al producto en cuestión.

Para la preparación de la suspensión inicial, utilizar como fluido de dilución al medio de enriquecimiento selectivo primario especificado en 5.2.

En general, para preparar la suspensión inicial, añadir una porción de prueba de  $x$  g o  $x$  ml de  $9x$  ml de o  $9x$  g de medio de enriquecimiento selectivo primario (5.2), para obtener una relación de la porción de prueba para medio de enriquecimiento primario selectivo de 1/10 (masa a volumen o volumen a volumen)

### **9.2 Enriquecimiento Primario**

Incubar (6.3b) la suspensión inicial, elaborada de acuerdo con 9.1 a  $30^{\circ}\text{C}$  por  $24\text{h}\pm 2\text{h}$ .

Nota 3. Se puede desarrollar una coloración negro durante la incubación

### **9.3 Enriquecimiento secundario**

**9.3.1** Después de la incubación de la suspensión inicial (enriquecimiento primario) durante  $24\text{h}\pm 2\text{h}$  (9.2), transferir 0,1 mL del cultivo obtenido en la sección 9.2 (independientemente de su color) a un tubo (6.7) que contiene 10 ml de medio de enriquecimiento secundario (caldo Fraser) (5.3)

**9.3.2** Incubar el medio inoculado (9.3.1) durante  $48\text{h}\pm 2\text{h}$  a  $35^{\circ}\text{C}$  o  $37^{\circ}\text{C}$

NOTA 4 La temperatura del medio inoculado debe ser acordado entre las partes afectadas y se registran en el informe de ensayo.

### **9.4 Siembra e identificación**

**9.4.1** Del cultivo de enriquecimiento primario incubado durante  $24\text{h}\pm 2\text{h}$  a  $30^{\circ}\text{C}$  (9.2), toma, por medio de un asa o varilla de vidrio (6.5) una porción del cultivo e inocular la superficie del primer medio de siembra en medio selectivo (Oxford agar) (5.4.1) de manera que se obtienen colonias bien separadas.

Proceder de la misma manera con el segundo medio selectivo de siembra (agar PALCAM) (5.4.2)

NOTA 5 esta siembra se lleva a cabo independientemente del color del medio.

**9.4.2** Del medio de enriquecimiento secundario que se incubó durante  $48\text{h}\pm 2\text{h}$  a  $35^{\circ}\text{C}$  o  $37^{\circ}\text{C}$  (9.3.2) repetir el procedimiento descrito en 9.4.1 con los dos medios selectivos de siembra.

**9.4.3** Invertir las placas obtenidas en 9.4.1 y 9.4.2 y colocarlos en una incubadora (6.3) calibrada a  $30^{\circ}\text{C}$ ,  $35^{\circ}\text{C}$  o  $37^{\circ}\text{C}$ . Las placas de agar PALCAM se incuban bien microaeróbicamente en una jarra (6.11) que contiene la mezcla de gases (6.12) o aeróbicamente

NOTA 6 La incubación del agar Oxford a  $30^{\circ}\text{C}$  es adecuado para productos alimenticios sólo ligeramente contaminados por una flora suplementaria. Para los productos muy contaminados por una flora suplementaria, es preferible incubar el agar Oxford a  $35^{\circ}\text{C}$  o  $37^{\circ}\text{C}$ , ya que las especies de *Listeria* tienden a desarrollar al mismo tiempo que la flora suplementaria. En todos los casos, la Temperatura de incubación del agar debe ser acordado entre las partes interesadas en el informe de la prueba

**9.4.4** Después de la incubación durante 24h y por 18h adicionales a 24h (si el crecimiento es leve o si no se observan colonias después de 24h de incubación), examinar las placas (9.4.3) para la presencia de colonias presuntivas de *Listeria* spp.

**9.4.4.1** Agar OXFORD: colonias típicas de *Listeria* spp, que se cultivan en agar Oxford durante 24 h son pequeñas colonias grisáceas (1 mm) rodeadas por halos de color negro. Después de 48 h, las colonias se vuelven más oscuras, con un posible brillo verdoso, alrededor 2 mm de diámetro, con halos negros y centros hundidos

**9.4.4.2** PALCAM agar: las placas se incubaron microaerobicamente, después de la incubación exponer las placas de agar PALCAM al aire durante 1 hora para permitir que el medio recupere su color rosado a púrpura.

Después de 24 h *Listeria* spp. Crecer como pequeñas o muy pequeñas colonias verde grisáceo o verde oliva, 1,5 mm a 2 mm de diámetro, con una depresión central y rodeadas de un halo negro.

### **9.5 Confirmación de *Listeria* spp.**

#### **9.5.1 Selección de colonias para la confirmación**

**9.5.1.1** Para la confirmación, toma de cada placa de cada medio selectivo (véase 9.4.4.1 y 9.4.4.2), cinco colonias presuntivas de *Listeria* spp.

Si en una placa hay menos de cinco colonias presuntivas, tome todas las colonias para la confirmación

**9.5.1.2** Estriar las colonias seleccionadas en la superficie de las placas de pre-secas de triptona de soja agar extracto de levadura (TSYEA) (5.5) de una manera que permitirá desarrollar colonias bien separadas.

Coloque las placas en la incubadora [6.3c] calibrada a 35°C o 37°C de 18h a 24h, o hasta que el crecimiento sea satisfactorio.

NOTA 7 la temperatura del medio inoculado debe ser acordado entre las partes afectadas y se registran en el informe de ensayo.

Colonias típicas son de 1 mm a 2 mm de diámetro, convexo incoloro y opaco, con un borde entero. Si las colonias no están bien separadas, elige una *Listeria* spp típica colonia a otra placa TSYEA. Lleve a cabo los siguientes exámenes de colonias de un cultivo puro de la TSYEA

Nota 8 la prueba de iluminación de Henry (véase el anexo C) puede ser usada, si es necesario. Para esta prueba, es importante que el medio de agar sea delgada (15 ml / placa)

#### **9.5.2 Reacción de catalasa**

Tome una colonia aislada obtenida en 9.5.1.2 y suspenderla en una gota de solución de peróxido de hidrógeno (5.11) sobre un portaobjetos. La formación inmediata de burbujas de gas indica una reacción positiva.

#### **9.5.3 Coloración Gram**

Realizar la coloración de Gram en una colonia separada en 9.5.1.2. *Listeria* spp. Se revelan como varillas cortas delgadas de Gram-positivos.

#### **9.5.4 ensayo de movilidad (si es necesario)**

Tome una colonia aislada obtenida en 9.5.1.2 y suspender en un tubo que contiene TSYEB (5.6)

Incubar en la incubadora [6,3 a] ajustado a 25°C de 8h a 24 hasta que se observe un medio nublado.

Depositar una gota del cultivo anterior usando un asa (6.5) en un portaobjetos de microscopio de vidrio limpio. Coloque un cubreobjetos encima y examinar con el microscopio (6.14). *Listeria* spp. Aparecen como delgados, varillas cortas con disminución de motilidad

El crecimiento de cultivos por encima de 25 ° C puede no presentar esta motilidad. Siempre compararlos con un cultivo conocido, Cocos, grandes varillas o varillas con motilidad rápida para moverse en el cultivo no son *Listeria* spp.

Como una prueba alternativa de movilidad, el uso de una aguja de inoculación (6.5), inocular el agar motilidad (5,9) con un cultivo tomado de una colonia típica de TSYEA (9.5.1.2). Incubarlo durante 48 h en la incubadora [6,3 a] a 25 ° C.

Examine de crecimiento alrededor del pinchazo. *Listeria* spp. Son móviles, dando un patrón de crecimiento parecido a un paraguas típico. Si el crecimiento no es suficiente, incubar hasta un máximo de 5 días y observar el pinchazo de nuevo

#### **9.6 La confirmación de *L. monocytogenes***

##### **9.6.1 Prueba de hemólisis**

Si las características morfológicas y fisiológicas y la reacción de catalasa son indicativos de *Listeria* spp., inocular las placas de agar de sangre de oveja (5.7) para determinar la reacción hemolítica.

Secar la superficie de agar bien antes de usarla. Tome una colonia separada en 9.5.1.2 y ponerla en la placa e inocular en cada cultivo, utilizando un cable (6.5). Al mismo tiempo inocular el positivo (*L. monocytogenes*) y los controles negativos (*L. innocua*)

Después de la incubación a 35 ° C o 37 ° C durante 24 h  $\pm$  2 h, se examinan las cepas de prueba y las de control. *L. monocytogenes* muestran, zonas de luz estrechos, claras (beta-hemólisis<sup>2</sup>), véase la figura 1). *L. innocua* no muestran ninguna zona clara alrededor de lo inoculado. *L. seeligeri* muestran una zona débil de hemólisis. *L. ivanovii* muestran generalmente anchas, zonas claramente delimitadas de b-hemólisis. Examinar las placas bajo una luz brillante para comparar los cultivos de ensayo con los de control.

NOTA 9 la reacción hemolítica también puede llevarse a cabo utilizando glóbulos rojos. Dispersar la colonia en 150µL de TSYEB (5,6); incubar a 35 ° C o 37 ° C durante 2 h. Añadir 150µL de ovejas glóbulos rojos en un 2% de solución de PBS (5.12). Incubar a 35 ° C o 37 ° C de 15 min a 60 min, luego refrigerar por 3 ° C  $\pm$  2°C durante aproximadamente 2 h. A continuación, examinar la presencia o ausencia de hemólisis. Si la reacción no es definitiva, dejar el cultivo a 3°C  $\pm$  2°C durante un máximo de 24 h.

##### **9.6.2 utilización de carbohidratos**

Inocular usando un asa (6.5) cada uno de los caldos de utilización de carbohidratos (5.8) con un cultivo de

TSYEB (9.5.4). Se incuba a 35°C o 37°C durante un máximo de 5 días. Las reacciones positivas (formación de ácido) se indican con un color amarillo y se producen sobre todo en las 24 h a 48 h.

### 9.6.3 Ensayo de CAMP

Estriar los cultivos de *Staphylococcus aureus* y *Rhodococcus equi* (B.10.4) en líneas únicas a lo largo de la placa de agar de sangre de oveja (5.7 o B.10.3) y así los dos cultivos son paralelos y diamétricamente opuestos (ver figura 1). Un inóculo delgado y uniforme. Esto se puede obtener mediante el uso de un asa de inoculación o un cable (6.5) sostenido en ángulos rectos al agar.

Estriar la cepa del análisis separada en 9.5.12 del mismo modo en ángulos rectos a estos cultivos para que así el cultivo de ensayo y los cultivos de *S. aureus* y *R. equi* no se toquen, y que estén distanciados de 1 a 2 mm. Varias cepas de ensayo pueden estriarse en la misma placa.

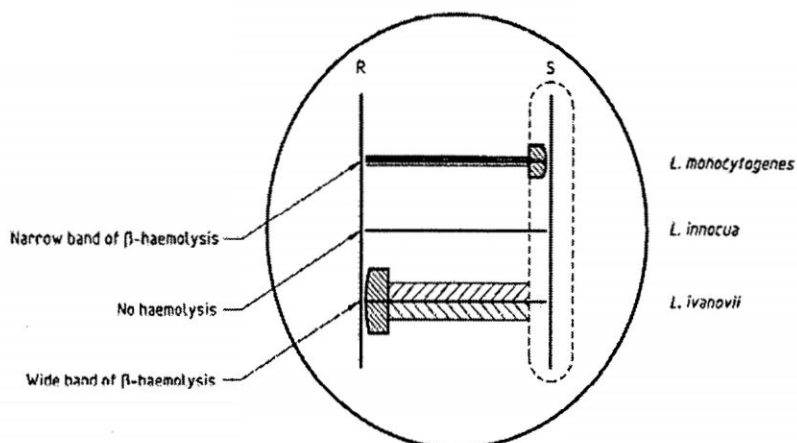


Figura 1 Inoculación e interpretación del test de CAMP

#### Notas

1. Inocular las placas de agar sangre delgadas (5,7 o B.10.3) como se muestra en el diagrama. Las líneas verticales representen rayas de *S. aureus* (S) y *R. equi* (R). Las líneas horizontales representan las rayas de los cultivos de ensayo.
2. Áreas sombreadas indican las ubicaciones de mayor hemólisis.

Simultáneamente, estriar Cultivos de control de *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *L. ivanovii*. Si se utiliza agar sangre (5,7). Incubar las placas a 35°C o 37°C de 18h a 24h. si se utilizan placas de doble capa (B. 10.3), se incuba a 35 ° C o 37 ° de 12 h a 18 h.

Una zona mejorada de B-hemólisis en la intersección de la cepa de prueba con cada uno de los cultivos de *S. aureus* y *R. equi* se considera que es una reacción positiva.

La reacción positiva con *R. equi* es visto como una amplia (5 mm a 10 mm) "punta de flecha" de hemólisis. La reacción se considera como negativo si una pequeña zona de hemólisis débil se extiende sólo aproximadamente 1 mm en la intersección de la cepa de prueba con la zona de difusión de la cultura *R. equi*. Una reacción positiva con *S. aureus* aparece como una pequeña zona de una mayor hemólisis se extiende sólo alrededor de 2 mm a partir de la cepa de ensayo y dentro de la zona débilmente hemolítica debido al crecimiento del cultivo de *S. aureus*. Grandes zonas de hemólisis no se producen en el área de *S. aureus* y *L. monocytogenes*.

### 9.7 Interpretación de las propiedades morfológicas y fisiológicas y de las reacciones bioquímicas

Todas las especies de *Listeria*. Son pequeñas varillas, Gram-positivas que demostraron motilidad. Son catalasa positiva. *L. monocytogenes* se distinguen de otras especies por las características enumeradas en la tabla 1.

### 9.8 Confirmación definitiva

Las cepas que se consideran *L. monocytogenes* (9.7) pueden ser enviadas a un laboratorio de referencia para la listeria reconocido serológica o, posiblemente, tipificación lisogénico. El envío deberá ir acompañada de toda la información relativa a la cepa Posible (S).

Table 1 — Reactions for the identification of *Listeria* spp.

Species	Haemolysis	Production of acid		CAMP test	
		Rhamnose	Xylose	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	-	-	-
<i>L. grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>	-	V	-	-	-

V: variable reaction  
 (+): weak reaction  
 +: > 90 % of positive reactions  
 -: no reaction

NOTE — There exist rare strains of *L. monocytogenes* which do not show  $\beta$ -haemolysis or a positive reaction to the CAMP test under the conditions described in this part of ISO 11290.

Nota existen cepas raras de *L. monocytogenes* que no muestran  $\beta$ -hemólisis o una reacción positiva a la prueba CAMP en las condiciones descritas en esta parte de la norma ISO 11290

#### 9.9 cultivos de control

Con el fin de comprobar la capacidad de los medios de enriquecimiento e identificación para apoyar el crecimiento selectivo de *L. monocytogenes*, una dilución del cultivo de referencia de las cepas recientemente aisladas de *L. monocytogenes* y las cepas de control negativo (por ejemplo, *Barras*, *Estreptococos*) debe ser introducido en un frasco de control del medio de enriquecimiento selectivo primario (véase el punto 9.2) añadir de 10 a 100 células de *L. monocytogenes* o cepas de control negativo por matraz.

Proceda con los frascos de control en cuanto a los cultivos de ensayo para demostrar que se recupera la cultura de control positivo

#### 10 Expresión de los resultados

De acuerdo con la interpretación de los resultados, reportar la presencia o ausencia de *Listeria monocytogenes* en la toma de muestras, especificando la masa en gramos, o el volumen, en mililitros, de la simple TESTD.

NOTA 10 si se aíslan otras especies de *Listeria*, éstos pueden hacerse constar en el informe de la prueba, si así se acuerda entre las partes interesadas

#### 11 Informe de prueba

El informe de la prueba debe especificar el método utilizado, las temperaturas de incubación y los resultados obtenidos. También mencionará todos los detalles operativos no especificados en esta parte de la ISO 11290, o considerados como opcionales, junto con detalles de las incidencias que puedan haber influido en los resultados.

El informe del ensayo debe incluir toda la información necesaria para la identificación completa de la simple

Anexo B  
(Normativo)

Composición y preparación del medio de cultivo y reactivos

B.1 Medio de enriquecimiento primario selectivo: Half caldo Fraser

B.1.1 Base

B.1.1.1 Composición

Peptona de carne (digerido péptico de tejido animal)	5,0g
Triptona (digerido péptico de caseína)	5,0g
Extracto de carne	5,0g
Extracto de levadura	5,0g
Cloruro de sodio	20,0g
Dihidrato de hidrógeno fosfato disódico	12,0g
Dihidrógeno fosfato de potasio	1,0g
Aesculin	1,0g
Agua	1 000 mL

B.1.1.2 Preparación

Disolver los componentes base o la base deshidratada completa en el agua, de ser necesario mediante su calentamiento.

Ajustar el pH, si es necesario, para que así después de la esterilización, sea  $7,2 \pm 0,2^3)$  a 25°C. Dispensar la base en los matraces (Subcláusula 6.7) con capacidades adecuadas, para obtener porciones apropiadas para el ensayo (ver Subcláusula 9.1).

Esterilizar por 15 min en la autoclave (Subcláusula 6.1) a 121°C.

NOTA 11 La solución de cloruro de litio (B.1.2) y solución de ácido nalidíxico (B.1.3) puede agregarse a la base (B.1.1) antes de usar la autoclave.

B.1.2 Solución de cloruro de litio

B.1.2.1 Composición

Cloruro de litio	3g
Agua	10 mL

3) Ver la ISO 7218.

B.1.2.2 Preparación

Agregar el cloruro de litio al agua.  
Esterilizar usando filtración.

**PELIGRO** – Tomar todas las precauciones necesarias al disolver el cloruro de litio en el agua como la reacción es altamente exotérmica. Asimismo, esta solución irrita las membranas mucosas.

**B.1.3 Solución de sal sódica de ácido nalidixico**

**B.1.3.1 Composición**

Sal sódica de ácido nalidixico	0,1g
Hidróxido de sodio, 0,05 mol/solución	10mL

**B.1.3.2 Preparación**

Disolver la sal del ácido nalidixico en el hidróxido de sodio.  
Esterilizar usando filtración.

**B.1.4 Solución clorhidrato de acriflavina**

**B.1.4.1 Composición**

Clorhidrato de acriflavina	0,25g
Agua	100mL

**B.1.4.2 Preparación**

Disolver el clorhidrato de acriflavina en el agua.  
Esterilizar usando filtración.

**B.1.5 Solución de citrato de amonio y hierro (III)**

**B.1.5.1 Composición**

Citrato de amonio y hierro (III)	5,0g
Agua	100mL

**B.1.5.2 Preparación**

Disolver el citrato de amonio y hierro (III) en agua.  
Esterilizar usando filtración.

**B.1.6 Medio completo**

**B.1.6.1 Composición**

Base (B.1.1)	100mL
Solución de cloruro de litio (B.1.2)	1,0mL
Sal sódica del ácido nalidixico (B.1.3)	0,1mL
Clorhidrato de acriflavina (B.1.4)	0,5mL
Citrato de amonio y hierro (III) (B.1.5)	1,0mL

**B.1.6.2 Preparación**

Inmediatamente antes de usar, agregar las cuatro soluciones (B.1.2 a B.1.5) a cada porción de 100mL de la base (B.1.1).

**B.2 Medio de enriquecimiento secundario selectivo: Caldo Fraser**

**B.2.1 Base**

**B.2.1.1 Composición**

Peptona de carne (digerido péptico de tejido animal)	5,0g
Triptona (digerido péptico de caseína)	5,0g
Extracto de carne	5,0g
Extracto de levadura	5,0g
Cloruro de sodio	20,0g
Dihidrato de hidrógeno fosfato disódico	12,0g
Dihidrato de hidrógeno fosfato de potasio	1,0g
Esculina	1,0g
Cloruro de litio	3,0g
Sal sódica de ácido nalidixico	0,02g
Agua	1 000 mL.

**B.2.1.2 Preparación**

Disolver los componentes o el medio deshidratado completo en el agua, si es necesario mediante su calentamiento.

Ajustar el pH, de ser necesario, para que después de la esterilización sea de  $7,2 \pm 0,2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ . Colocar el medio en tubos de ensayo de capacidad adecuada para obtener las porciones apropiadas para el ensayo.

Esterilizar por 15 min en la autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$ .

**B.2.2 Solución clorhidrato de acriflavina**

Véase B.1.4.

**B.2.3 Solución de citrato de amonio y hierro (III)**

Véase B.1.5.

**B.2.4 Medio completo**

Inmediatamente antes de usar, a cada tubo (10mL de volúmenes) de base (B.2.1), agregar porciones de 0,1mL de las soluciones B.2.2 y B.2.3. Mezclar suavemente.

**B.3 Primer medio selectivo: Agar Oxford**

**B.3.1 Agar Base**

**B.3.3.1 Composición**

Columbia agar	39,0g
Esculina	1,0g
Citrato amonio férrico	0,5g
Cloruro de litio	15g
Agua	1 000 mL

**B.3.1.2 Preparación**

Disolver los componentes o el medio deshidratado completo en el agua, si es necesario mediante su calentamiento.

Ajustar el pH, de ser necesario, para que después de la esterilización sea de  $7,2 \pm 0,2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ . Esterilizar por 15 min en la autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$ .

**B.3.2 Suplemento para 1000mL de medio**

**B.3.2.1 Composición**

Ciclohexamida	400mg
Sulfato de colistina	20mg
Clorhidrato de acriflavina	5,0mg
Cefotetan	2,0mg
Fosfomicin	10mg
Etanol	5,0ml
Agua	5,0ml

**B.3.2.2 Preparación**

Disolver los componentes o el medio deshidratado completo en una mezcla de agua y alcohol.

Esterilizar y filtrar

B.3.3 Preparación del medio completo

Base fresca (B.3.1) hasta aproximadamente 47° C y adicionar el suplemento (B.3.2).

Dipense el medio en placas estériles una cantidad de 15mL y dejar solidificar.

Almacenar el medio lejos de la luz.

B.4 Segundo medio selectivo: Agar PALCAM

B.4.1 Agar Base

B.4.1.1 Composición

Peptona	23g
Almidón	1g
Cloruro de sodio	5g
Extracto de levadura	3g
D-Glucosa	0,5g
D-manitol	10g
Esculina	0,8g
Citrato amonio férrico	0,5g
Rojo fenol	0,08g
Cloruro de litio	15g
Agar	9g a 18g
Agua	960mL

B.4.1.2 Preparación

Disolver los componentes o el medio completo deshidratado en agua hirviendo.

Ajustar el pH, de ser necesario, para que después de esterilizarlos sea 7,3±0,2 a 25°C.

Esterilizar por 15 min en la autoclave a 121°C.

B.4.2 Solución sulfato polimixina B

B.4.2.1 Composición

Sulfato de polimixina B	0,1g
Agua	100mL

B.4.2.2 Preparación

Disolver el polimixina B en agua. Esterilizar usando filtración.

B.4.3 Solución de clorhidrato de cicloheximida

B.4.3.1 Composición

Clorhidrato de Cicloheximida	0,05g
Agua	100mL

B.4.3.2 Preparación

Disolver el Clorhidrato de Cicloheximida en agua. Esterilizar usando filtración.

B.4.4 Solución de ceftazidima pentahidratado

B.4.4.1 Composición

Ceftazidima pentahidratado	0,116g
Agua	100mL

B.4.5.1 Medio completo

B.4.5.1 Composición

Base (B.4.1)	960mL
Solución de polimixina B (B.4.2)	10mL
Solución de clorhidrato de acriflavina (B.4.3)	10mL
Solución de ceftazidima pentahidratado (B.4.4)	20mL

B.4.5.2 Preparación

A la base fundida (B.4.1) a 47°C, adicionar las soluciones B.4.2 a B.4.4, mezclar suavemente en cada adición.

#### B.4.6 Preparación de las placas de agar

Colocar las placas de manera apropiada y adicionar 15mL de medio preparado y dejar solidificar.

#### B.5 Medio de cultivo sólido: Triptona de soja extracto de levadura (TSAYE)

##### B.5.1 Composición

Caldo de Triptona de soja <sup>1)</sup>	30g
Extracto de levadura	6g
Agar	9g a 18g <sup>2)</sup>
Agua	1 000 mL
<sup>1)</sup> Triptona	17,0g
Peptona de soja	3,0g
Cloruro de sodio	5,0g
Fosfato de dipotasio	2,5g
Fosfato de dipotasio	2,5g
Glucosa	2,5g
<sup>2)</sup> Dependiendo de la dureza del gel del agar.	

##### B.5.2 Preparación

Disolver los componentes o el medio completo deshidratado en agua hirviendo.

Ajustar el pH, de ser necesario, para que después de esterilizarlos sea 7,3±0,2 a 25°C.

Colocar el medio en tubos de capacidad adecuada para obtener porciones adecuadas para el ensayo.

Esterilizar por 15 min en la autoclave a 121°C.

Dejar solidificar en posición inclinada.

Para la preparación de las placas de agar, colocar el medio en placas Petri estériles en porciones adecuadas para el ensayo. Dejar solidificar.

#### B.6 Medio de cultivo líquido: Caldo de Triptona de soja de extracto de levadura (TSYEB)

##### B.6.1. Composición

Caldo de triptona de soja <sup>1)</sup>	30g
Extracto de levadura	6g
Agua	1 000 mL
<sup>1)</sup> Véase B.5.1	

##### B.6.2 Preparación

Disolver los componentes o el medio deshidratado completo en agua, de ser necesario mediante su calentamiento.

Ajustar el pH, si es necesario, para que después de esterilizarlos sea 7,3±0,2 a 25°C.

Colocar el medio en matraces o tubos de capacidad adecuada para obtener porciones para el ensayo.

Esterilizar por 15 min en la autoclave a 121°C.

#### B.7 Agar de sangre de ovino

##### B.7.1 Base

##### B.7.1.1 Composición

Peptona de carne	15g
Digestivo de hígado	2,5g
Extracto de levadura	5g
Cloruro de sodio	5g
Agar	9g a 18g <sup>1)</sup>
Agua	1 000mL
<sup>1)</sup> Dependiendo de la dureza del gel del agar.	

##### B.7.1.2 Preparación

Disolver los componentes con agua hirviendo.

Ajustar el pH, de ser necesario, para que después de la esterilización sea 7,2±0,2 a 25°C.

Colocar el medio en matraces de capacidad adecuada para obtener porciones apropiadas para el ensayo.

Esterilizar por 15 min en la autoclave a 121°C.

**B.7.2 Sangre de ovino desfibrinada**

**B.7.3 Base completa**

**B.7.3.1 Composición**

Base (B.7.1)	100mL
Sangre de ovino desfibrinada	5mL a 7 mL

**B.7.3.2 Preparación**

Agregar la sangre a la base previamente enfriada a 47°C. Mezclar bien. Colocar el medio en placas Petri estériles en porciones adecuadas para el ensayo. Permitir solidificar.

**B.8 Caldo de utilización de carbohidratos (ramnosa y xilosa)**

**B.8.1 Base**

**B.8.1.1 Composición**

Peptona de proteosa	10g
Extracto de carne	1g
Cloruro de sodio	5g
Púrpura bromocresol	0,02g
Agua	1 000mL

**B.8.1.2 Preparación**

Disolver los componentes en agua, de ser necesario, mediante su calentamiento. Ajustar el pH, si es necesario, para que después de esterilizar sea después 6,8±0,2 a 25°C. Colocar el medio en tubos de capacidad adecuada para obtener porciones apropiadas para el ensayo. Esterilizar por 15 min en la autoclave a 121°C.

**B.8.2 Soluciones de carbohidratos**

**B.8.2.1 Composición**

Carbohidrato <sup>1)</sup>	5g
Agua	100mL
<sup>1)</sup> L-Ramnosa o D-xilosa	

**B.8.2.2 Preparación**

Disolver por separado cada carbohidrato en 100mL de agua. Esterilizar usando filtración.

**B.8.3 Medio completo**

Para cada carbohidrato, agregar aseptícamente x mL de solución del apartado B.8.2 a 9x mL de la base (B.8.1).

**B.9 Agar de motilidad**

**B.9.1 Composición**

Peptona de caseína	20,0g
Peptona de carne	6,1g
Agar	3,5g
Agua	1 000mL

**B.9.2 Preparación**

Disolver los componentes en agua hirviendo. Ajustar el pH, de ser necesario, para que después de esterilizar sea 7,3±0,2 a 25°C. Colocar el medio en tubos en cantidades de aprox. 5mL. Esterilizar por 15 min en la autoclave a 121°C.

**B.10 Medio CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen) y cepas de ensayo**  
Las placas de agar de sangre de ovino (B.7) pueden utilizarse para este ensayo, pero es preferible para usar las placas de doble capa con una capa muy fina de sangre (B.10.3).

**B.10.1 Base**  
Véase B.7.1.

**B.10.2 Medio de sangre de ovino**  
Véase B.7.3.1.

**B.10.3 Medio completo**  
Colocar la base (B.10.1) en placas Petri en cantidades de aprox. 10 mL y dejar solidificar. Verter una capa delgada del medio de sangre (B.10.2) utilizando cantidades no mayores que 3mL por placa.  
Dejar solidificar. Si el medio de sangre se añade a las placas que contienen la base que han sido preparadas con anticipación, puede ser necesario calentar las placas por 20 min colocándolas en una incubadora a 37°C antes de verter la capa del medio de sangre.

**B.10.4 Cepas de reacción CAMP**  
Una cepa de  $\beta$ -hemolítica de *S. aureus* (por ejemplo, NCTC 1803 o ATCC 25923) y una cepa de *R. equi* (por ejemplo NCTC 1621 o ATCC 6936) se requieren para realizar la prueba de CAMP. No todas las cepas de *S. aureus* son disponibles para la prueba de CAMP.  
Mantener los cultivos stock de *S. aureus*, *R. equi*, *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *L. ivanovii* mediante la inoculación de las inclinaciones de TSAYE (B.5.2), incubándolas a 35°C o 37°C por 24h a 28h, o hasta que se presente el crecimiento, y almacenándolas en el refrigerador a 3°C±2°C. Realizar el sub-cultivo como mínimo una vez al mes.

**B.11 Solución peróxido de hidrógeno**  
Utilizar un 3% (m/m); es decir, solución de 10 volúmenes.

**B.12 Tampón fosfato salino (PBS)**  
B.12.1 Composición

Dihidrato de hidrógeno fosfato disódico	8,98g
Fosfato de dihidrógeno de sodio	2,71g
Cloruro de sodio	8,5g
Agua	1 000mL

**B.12.2 Preparación**  
Disolver los componentes en agua.  
Ajustar el pH, de ser necesario, para que después de esterilizar sea 7,2±0,2 a 25°C.  
Esterilizar en la autoclave por 15 min a 121°C.

**Anexo 2. Método ISO 11290-1:1996 microbiología de los alimentos y piensos método horizontal para la detección y enumeración de *Listeria monocytogenes* Amd 1:2004 modificación de los medios de aislamiento.**

# INTERNATIONAL STANDARD

# ISO 11290-1

First edition  
1996-12-15  
**AMENDMENT 1**  
2004-10-15

---

## **Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* —**

### **Part 1: Detection method**

**AMENDMENT 1: Modification of the isolation  
media and the haemolysis test, and inclusion  
of precision data**

*Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche et  
le dénombrement de Listeria monocytogenes —*

*Partie 1: Méthode de recherche*

*AMENDEMENT 1: Modification des milieux d'isolement, de la  
recherche de l'hémolyse et introduction de données de fidélité*

---

Licensed to CER  
ISO Store orders  
Single user licence



©100011884 / null  
Downloaded: 2012-03-21  
and networking prohibited

Reference number  
ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004(E)

© ISO 2004

**Microbiología de los alimentos la alimentación animal - Método horizontal para la detección y recuento de *Listeria monocytogenes***

**MODIFICACIÓN 1: Modificación de los medios de aislamiento y la prueba de hemólisis, y la inclusión de los datos de precisión.**

**Parte 1:**

**Método de Detección**

**Subcláusula 4.3**

Reemplazar esta subcláusula por la siguiente

**4.3 Siembra e identificación**

A partir de los cultivos obtenidos en 4.1 y 4.2, sembrar en los dos medios sólidos selectivos:

- Agar listeria según Ottaviani y Agosti (ALOA) (véase la referencia (1) y B.3)
- Cualquier otro medio sólido selectivo es la elección del laboratorio de forma complementaria al Agar Listeria según Ottaviani y Agosti, como Oxford o PALCAM. La incubación de la Listeria Agar según Ottaviani y Agosti a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y el examen después de  $24\text{h} \pm 3\text{h}$ , y si necesario después de otras  $24\text{h} \pm 3\text{h}$ , para comprobar la presencia de colonias características que se suponen ser *L. monocytogenes*

La incubación del segundo medio selectivo realizae el examen apropiado y después de la hora apropiada.

**Subcláusula 5.4.1 y 5.4.2**

Reemplazar estas subcláusulas por el texto siguiente

**5.4.1** Primer medio: Agar Listeria según Ottaviani y Agosti (ALOA) (1) Ver B.3.

**5.4.2 Segundo medio**

La elección del segundo medio se deja a la discreción del laboratorio de pruebas. Si se utiliza un medio comercial, las instrucciones del fabricante deberán seguirse con precisión en cuanto a su preparación para su uso.

1) ALOA es un ejemplo de un medio adecuado disponible comercialmente. Esta información se da para la comodidad de usuario de esta parte de la ISO 11290 y no constituye un aval por parte de ISO de este producto. Se permite el uso de otros medios de comunicación con la misma formulación.

**Subcláusula 9.4**

Reemplazar esta subcláusula por la siguiente 9.4

**9.4.1** Desde el cultivo de enriquecimiento primario incubada durante  $24\text{h} \pm 3\text{h}$  a  $30^{\circ}\text{C}$  (9.2), tomar por medio de un asa o varilla de vidrio (6.5), una porción del cultivo e inocular la superficie del primer medio de siembra selectivo, el agar de Listeria según Ottaviani Agosti y (5.4.1), por lo que se obtendrán colonias bien separadas.

Proceda de la misma manera con el segundo medio selectivo de siembra (5.4.2)

Reemplace 9.4.3 por el siguiente

**9.4.3** Invertir las placas obtenidas en 9.4.1 y 9.4.2 y colocarlas en una incubadora a  $37^{\circ}\text{C}$  para Listeria Agar según Ottaviani y Agosti (5.4.1) y en la Temperatura adecuada para el segundo medio selectivo (5.4.2). Si un medio comercial se utiliza para el segundo medio selectivo, siga las instrucciones del fabricante.

Eliminar la Nota 6.

Reemplace 9.4.4 por el siguiente:

**9.4.4** Después de la incubación durante  $24\text{h} \pm 3\text{h}$  (y  $24\text{h} \pm 3\text{h}$  adicional si el crecimiento es débil o si no se observa la colonia después de 24 horas de incubación) para el agar de Listeria según Ottaviani y Agosti o durante el tiempo apropiado (segundo agar selectivo), examinar las placas (9.4.3) en busca de la presencia de colonias que se presumen *Listeria spp*

Reemplazar 9.4.4.1 por el texto siguiente:

**9.4.4.1** Agar Listeria según Ottaviani y Agosti: Considerar como *L. monocytogenes* de las colonias verde-azules rodeadas de un halo opaco (colonias típicas) Si el crecimiento es leve, o si no se observa ninguna colonia, o si ninguna colonia típica está presente a las  $24\text{h} \pm 3\text{h}$  de incubación, volver a incubar las placas durante otras  $24\text{h} \pm 3\text{h}$ .

Nota 1 Algunas cepas de *L. monocytogenes* muestran un halo muy débil (incluso sin halo) en casos de estrés, en particular, el estrés ácido.

Nota 2 Algunos *L. monocytogenes* se caracterizan por una actividad lenta del PIPLC (fosfatidil inositol fosfolipasa C). Tales bacterias se detectan cuando la duración total de incubación es mayor, por ejemplo, a 4 días. Algunas de estas cepas podrían ser patógenos (véase la referencia (2))

Reemplazar 9.4.4.2 por el siguiente texto:

9.4.4.2 Segundo medio selectivo: Examinar después del momento adecuado para comprobar la presencia de colonias que, de sus características, son considerados como presuntivas de *Listeria* spp. o monocitogenes, dependiendo del tipo de medio utilizado.

Subcláusula 9.6.1 prueba de hemólisis

Insertar los números subcláusula 9.6.1.1 en el comienzo del texto de 9.6.1

Reemplace Nota 9 por el siguiente inciso:

**9.6.1.2** La reacción hemolítica también puede llevarse a cabo de la siguiente manera utilizando ovejas glóbulos rojos.

Dispersar la colonia en 150 ul de TSYEB (B.6); incubar a 37 ° C durante 2 h. Añadir 150 ul de una suspensión de glóbulos rojos de oveja (B4 de esta enmienda). Incubar a 37 ° C durante 15 minutos a 60 minutos, luego refrigerar a 3 ° C y 2 ° C durante aproximadamente 2 horas. Examine para la actividad hemolítica. Si la reacción no es definitiva, dejar a 3 ° C - 2°C durante un máximo de 24h-3h

Añadir el siguiente apartado después del apartado 10.

## **11 Precisión del método**

### **11.1 General**

No es posible expresar la precisión de un método cualitativo mediante el uso de los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad que pueden calcularse únicamente para los métodos cuantitativos. Así, las nuevas características de rendimiento han sido seleccionadas (véase la referencia [3]). Estas características son: la precisión (sensibilidad de las muestras positivas, especificidad para muestras negativas) y concordancia (véase 11.2, 11.3 y 11.4). Los valores de estas características se han determinado mediante una prueba de interlaboratorio del método organizado en el marco de un proyecto europeo (véase el anexo D). Las características de rendimiento se determinaron utilizando tres tipos de alimentos contaminados en los distintos niveles y de materiales de referencia. Los valores derivados de la prueba de interlaboratorios pueden no ser aplicables a rangos de concentración de analitos y matrices diferentes a los que figuran en el anexo D.

**ADVERTENCIA** --- el método que se analizó fue sin esta modificación, es decir, el aislamiento se realizó en los agares de PALCAM y Oxford. Los datos de precisión se dan algunas orientaciones generales para el usuario en el rendimiento global del método y estos datos de precisión se aplican, en particular, a esta parte de la ISO 11290 junto con esta enmienda cuando el segundo agar de aislamiento es Oxford O PALCAM.

### **11.2 Precisión**

#### **11.2.1 Definición**

La precisión es el porcentaje de muestras identificadas correctamente. Para las muestras positivas, la precisión se llama sensibilidad y es el porcentaje de muestras correctamente identificadas como positivas. A los efectos de este cálculo, se debe suponer que todas las muestras supuestamente positivas, de hecho, contienen el organismo. Para las muestras negativas, la precisión es llamada especificidad y es el porcentaje de muestras correctamente identificados como negativas.

#### **11.2.2 Valores generales**

Como indicación general de especificidad (E), el valor siguiente se puede utilizar cuando el análisis de muestras de alimentos en general: Sp = 97,4%.

Como indicación general de especificidad (E), el valor siguiente se puede utilizar cuando el análisis de muestras de alimentos en general: Ver = 85,2%.

Para materiales de referencia (cápsulas que contienen 23 CFU, preparado por RIVM, Países Bajos para el juicio), el siguiente valor se ha obtenido: Se = 89,5%.

Estos valores pueden ser interpretados en el sentido de que una muestra que contiene *L. monocytogenes* se reconoció como positivo cuando se analiza con el método descrito en esta parte de la norma ISO 11290-1 en 85,2% de los casos.

### **11.3 Conformidad**

#### **11.3.1 Definición**

Conformidad es el porcentaje de posibilidades de encontrar el mismo resultado (es decir, tanto positivos) a partir de dos porciones de ensayo identical analizadas en el mismo laboratorio, en condiciones de repetibilidad (es decir, un operador usando el mismo aparato y los mismos reactivos en el intervalo de tiempo más breve posible). Por consiguiente, la conformidad es el equivalente de la repetibilidad de los métodos cuantitativos. Para el cálculo de acuerdo con los resultados de un ensayo interlaboratorios, la probabilidad de que dos muestras dan los mismos resultados se calcula para cada laboratorio participante, a su vez, y esta probabilidad es entonces promedió overa laboratorios II.

### 11.3.2 Valore globales

Como indicación general de conformidad (Ac), el siguiente valor se puede utilizar cuando el análisis de muestras de alimentos en general:  $Ac = 88,7\%$   
Para materiales de referencia (cápsulas que contienen 23 CFU, preparado por RIVM, Países Bajos, para el juicio), el siguiente valor se puede utilizar:  $Ac = 88,2\%$   
Estos valores pueden ser interpretados en el sentido de que si dos porciones de ensayo idénticas de una muestra contenga L. monocytogenes son analizadas por el mismo operador en poco tiempo y con las mismas condiciones de operación, te es una oportunidad 88,7% de la obtención de la misma resultado (presencia de L. monocytogenes) para las dos partes de la prueba.

### 11.4 Concordancia

#### 11.4.1 Definición

La concordancia es el porcentaje de posibilidades de encontrar el mismo resultado para dos muestras idénticas analizadas en dos laboratorios diferentes. Por consiguiente, la concordancia es el equivalente de la reproducibilidad de los métodos cuantitativos. Para calcular concordancia partir de los resultados de un ensayo interlaboratorios, cada observación en cada laboratorio participante se toma, a su vez, la vinculación con los resultados obtenidos para la muestra en particular por todos los otros laboratorios. La concordancia es el porcentaje de todos los vínculos que dan los mismos resultados en todos los emparejamientos Posible de datos.

#### 11.4.2 Valores globales

Como indicación general de concordancia (Cc), el siguiente valor de mi utilizarse al probar muestras de alimentos en general:  $Cc = 84,4\%$   
Para materiales de referencia (cápsulas que contienen 23 CFU, preparado por RIVM, Países Bajos, para el juicio), el valor siguiente se puede utilizar:  $Cc = 80,8\%$ .  
Estos valores pueden ser interpretados en el sentido de que si dos porciones idénticas de ensayo de una muestra que contiene L. monocytogenes) para las dos partes de la prueba

Reemplazar la cláusula B.3 con lo siguiente:

B.3 Agar para *Listeria* de acuerdo con Ottaviani y Agosti (ALOA)<sup>2)</sup>

B.3.1 Medio base

B.3.1.1 Composición

Digestivo enzimático de tejidos animales	18g
Digestivo enzimático de caseína	6g
Extracto de levaduras	10g
Piruvato de sodio	2g
Glucosa	2g
Glicerofosfato de magnesio	1g
Sulfato de magnesio (anhidro)	0,5g
Cloruro de sodio	5g
Cloruro de litio	10g
Hidrógeno fosfato de disodio (anhidro)	2,5g
5-Bromo 4-cloro 3-indolil β-D-glucopiranososa	0,05g
Agar	12g a 18g <sup>a</sup>
Aqua	930mL <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Dependiendo de la dureza del gel del agar.

<sup>b</sup> 925mL si la solución de anfotericina B se utiliza (ver B.3.5.2)

B.3.1.2 Preparación

Disolver los componentes deshidratados o la base deshidratada completa con agua mediante la ebullición.

Esterilizar por 15min en la autoclave a 121°C.

Ajustar el pH, de ser necesario, para que después de la esterilización sea 7,2±0,2.

B.3.2 Solución de ácido nalidíxico

Sal sódica de ácido nalidíxico	0,02g
Hidróxido de sodio (0,05 mol/L)	5mL

Disolver la sal sódica del ácido nalidíxico en 5mL de hidróxido de sodio y esterilizar usando filtración.

2) ALOA es un ejemplo de un medio disponible adecuado comercialmente. Esta información se da para la conveniencia de los usuarios de esta parte de la ISO 11290 y no constituye como publicidad por parte de la ISO de este producto. El uso de otro medio con la misma fórmula se permite.

B.3.3 Solución de ceftazidima

Ceftazidima	0,02g
Agua	5mL

Disolver la ceftazidima en 5 mL de agua y esterilizar usando filtración a través de una membrana de 0,45µm.

B.3.4 Solución de Polimixina B

Sulfato de polimixina B	76 700 UI
Agua	5mL

Disolver el polimixina B en 5mL de agua. Esterilizar usando filtración a través de una membrana de 0,45µm.

B.3.5 Suplemento antibiótico

B.3.5.1 Solución de cicloheximida

Cicloheximida	0,05g
Etanol	2,5mL
Agua	2,5mL

Disolver cicloheximida en 2,5mL de etanol, luego agregar 2,5mL de agua. Esterilizar usando filtración a través de una membrana de 0,45µm.

**B.3.5.2 Solución de anfotericina B (como una alternativa a la solución cicloheximida)**

Anfotericina B	0,01g
HCl (1mol/L)	2,5mL
Dimetilformamida (DMF)	7,5mL

Disolver el anfotericina en la solución HCl/DMF. Esterilizar usando filtración a través de una membrana de 0,45µm.

**PELIGROSO** – La solución de HCl/DMF es tóxico, manejar con cuidado.

**B.3.6 Suplemento**

Disolver 2g de L-α-fosfatidilinositol (Sigma P6636<sup>3)</sup>) en 50mL de agua fría. Agitar por aprox. 30 min hasta que se obtiene una suspensión homogénea. Usar la autoclave a 121°C por 15min y enfriar a 48°C a 50°C.

3) P 6636 es un nombre comercial de un producto abastecido por Sigma. Esta información se brinda para la conveniencia de los usuarios de esta parte de la ISO 11290 y no constituye una publicidad por ISO de este producto. Los productos equivalentes pueden utilizarse si se comprueba que conllevan a los mismos resultados.

**B.3.7 Medio completo**

**B.3.7.1 Composición**

Medio de cultivo base (B.3.1)	930mL <sup>a</sup>
Solución de ácido nalidixico (B.3.2)	5mL
Solución de ceftazidima (B.3.3)	5mL
Solución de polimixina B (B.3.4)	5mL
Solución de cicloheximida (B.3.5)	5mL
o Solución de anfotericina B (B.3.5.2)	10mL
Suplemento (B.3.6)	50mL
<sup>a</sup> 925mL si se utiliza solución de anfotericina B	

**B.3.7.2 Preparación**

Agregar las soluciones de la base a aprox. 50°C, mezclando bien entre cada adición.

El pH del medio completo deberá ser 7,2±0,2°C a 25°C.

El medio deberá ser homogéneamente opaco.

**B.3.7.3 Preparación de las placas de agar**

Colocar en cada placa Petri de 15 a 20 mL del medio completo recientemente preparado, luego, permitir que se solidifique.

**B.3.8 Pruebas de rendimiento para el aseguramiento de calidad del medio de cultivo**

Para las definiciones de selectividad y productividad referidas a la ISO/TS 11133-2. La Tabla B.1 brinda detalles de prueba de rendimiento con relación al Agar para *Listeria* de acuerdo con Ottaviani y Agosti.

Tabla B.1 – Prueba de rendimiento de Agar para *Listeria* de acuerdo a Ottaviani y Agosti

Función	Incubación	Cepas de control	Medio de referencia	Método de control	Criterio	Reacciones características
Productividad	37°C por 48h	<i>L. monocytogenes</i> 4b ATCC 13932 <sup>a</sup> y/o <sup>b</sup> <i>L. monocytogenes</i> 1/2a ATCC 19111 (u otras cepas equivalentes en un recolección reconocida de microorganismos)	TSA	Cuantitativo	PR ≥ 0,5	Colonias verde azuladas con halo opaco
Especificidad	37°C por 48h	<i>L. innocua</i> ATCC 33090 (u otras cepas equivalentes en una recolección de microorganismos)		Cualitativo		Colonias verde azuladas con halo opaco
Selectividad	37°C por 48h	<i>E. coli</i> ATCC 25922 o 8739 <sup>a</sup> y/o <sup>b</sup> <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 o 19433 (u otras cepas equivalentes en una recolección reconocida de microorganismos)		Cualitativo	Inhibición total	

<sup>a</sup> Cepa a ser utilizada por el laboratorio usuario (como mínimo).  
<sup>b</sup> Ambas cepas a ser utilizadas por los fabricantes de los medios de cultivo.

#### B.4 Suspensión de glóbulos rojos de sangre de ovino

Mantener los glóbulos rojos de sangre de ovino a 3°C±2°C antes de usar.

Antes de usar, examinar por signos de hemólisis (enrojecimiento) en la capa superior del suero.

De no ocurrir hemólisis, introducir 2mL de la capa inferior de glóbulos rojos en 98mL de tampón PBS (B.12).

De presentar hemólisis, suspender aproximadamente 4mL de la capa de glóbulos rojos en 10mL de tampón PBS y mezclar suavemente, luego centrifugar. Si el sobrenadante líquido claramente se vuelve rojo, debido a una significativa hemólisis, no utilizar la suspensión stock y descartarla. De otra manera, decantar el sobrenadante líquido y agregar 2mL de esta solución de glóbulos rojos a 98mL de tampón PBS.

Mantener la suspensión por 5 días a 3°C±2°C. Descartarla si se presenta hemólisis.

## **Anexo 3. Método ISO 1 8593: 2004. Microbiología de los alimentos y piensos Métodos horizontales para la técnica de muestreo de superficie utilizando placas de contacto e hisopos.**

### **Microbiología de los alimentos y piensos. Métodos horizontales para la técnica de muestreo de superficie utilizando placas de contacto e hisopos**

#### **PRÓLOGO**

ISO (la Organización Internacional de Estandarización) es una federación mundial de organismos nacionales de normalización (miembros de la ISO). El trabajo de preparación de Normas Internacionales es normalmente realizado a través de los comités técnicos de la ISO. Cada organismo miembro interesado en una materia para la cual se haya establecido un comité técnico, tiene el derecho de estar representado en dicho comité. Las organizaciones internacionales, gubernamentales y no gubernamentales en colaboración con ISO, también participan en el trabajo. ISO colabora estrechamente con la Comisión Electrotécnica Internacional (CEI) en todos los temas referentes a la normalización electrotécnica.

Las Normas Internacionales son redactadas de acuerdo con las reglas dadas en las Directrices ISO/CEI, Parte 2.

La tarea principal de los comités técnicos es preparar las Normas Internacionales. Los borradores de las Normas Internacionales adoptados por los comités técnicos son circulados a las organizaciones miembros para su votación. La publicación como una Norma Internacional requiere aprobación de al menos el 75% de aceptación de las organizaciones miembros.

Llama la atención a la posibilidad que algunos de los elementos de este documento puede ser el sujeto de los derechos de patente. ISO no se hará responsable de la identificación de uno o todos los derechos de dichas patentes.

ISO 18593 fue preparada por el Comité Técnico ISO / TC 34, Productos alimenticios, Subcomité SC 9, Microbiología

#### **INTRODUCCIÓN**

Es importante determinar la presencia del número de los microbios viables en las superficies de utensilios de cocina, superficie de trabajo y otros equipos en contacto con alimentos para estimar el nivel de contaminación durante la producción, sobre la eficacia de la limpieza y desinfección de los protocolos.

Los métodos horizontales descritos en esta norma incluyen un método de contacto superficie con placa de contacto y un método de hisopo. El método de contacto de placa sólo es aplicable a superficies planas, mientras que el método hisopo se puede utilizar para todos los tipos de superficies, para el muestreo de grandes superficies (100 cm), pueden utilizarse paños o esponjas estériles. Este método alternativo es útil para la carga microbiana de la superficie. Los resultados se presentan a menudo como base de las puntuaciones profilácticos de don el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por centímetro cuadrado presente en una superficie de prueba.

#### **1. Ámbito de aplicación**

Este Estándar Internacional especifica los métodos horizontales para técnicas de muestreo utilizando placas de contacto o hisopos en superficies en el entorno de la industria de alimentos (y las plantas de procesamiento de alimentos), con el fin de detectar o enumerar microorganismos viables.

**Nota** El término "medio ambiente" se refiere a cualquier elemento de contacto con la fuente de alimentación Producto o recontaminación, por ejemplo, material, locales, operadores.

#### **2. Referencias normativas**

Los siguientes documentos de referencia son indispensables para la aplicación de este documento. Para las referencias sin fecha se aplica la última edición del documento de referencia (incluyendo cualquier modificación).

#### **3. Principio**

**3.1** Debido a que estos métodos no son cuantitativamente confiables o reproducibles, los resultados sólo se deben utilizar en un "análisis de tendencias".

**3.2** Una placa de contacto (o dipslide) lleno con un medio de agar adecuado es presionado contra la superficie a ensayar. Después de la incubación, una estimación de la contaminación de la superficie se obtiene contando el número de colonias desarrolladas.

**3.3** Utilizando el método de hisopo, un área específica de la superficie a ser examinado se marca (por ejemplo, utilizando una plantilla) y después se limpia. Los palillos de hisopo se rompen en un tubo o botella que contiene un fluido de dilución estéril o la neutralización de líquido y se mezclan con la mano.

En la superficie se limpia con un paño estéril (húmedo) o una esponja, el dispositivo de muestreo se almacena en un volumen conocido de líquido de dilución (por ejemplo, 100 ml para 100cm<sup>2</sup>)

En el laboratorio, la suspensión inicial y si necesario, las diluciones decimales se utilizan para determinar el número de microorganismos utilizando los procedimientos descritos en los métodos para la enumeración de los (grupos de) microorganismos que ser investigado.

**NOTA** El tiempo de incubación y temperatura dependen del tipo de microorganismos a detectar.

**3.4** Para medios selectivos, las pruebas confirmatorias apropiadas pueden realizar, el número de unidades formadoras de colonias de microorganismos específicos por centímetro cuadrado o por hisopo se calcularon los datos del número de colonias (confirmado).

**3.5** Después del muestreo, la superficie se limpia y se desinfecta, si es necesario, para evitar trazas de nutrientes resultantes del procedimiento de toma de muestras que queda en la superficie muestreada.

#### **4. Medios de cultivo y dilución de líquidos**

**NOTA** Para obtener más información, consulte las normas internacionales pertinentes para los microorganismos diana a detectar o enumerados.

##### **4.1 Líquido neutralizante**

En general, la base para la neutralización de líquido es agua de peptona tamponada, o sal de peptona, o cualquier otro diluyente adecuado (tal como solución buffer fosfato a pH 7,5, solución de peptona al 1 g / l).

En los casos donde se espera que los residuos de desinfectantes, neutralizadores apropiados deben añadirse al fluido de dilución y de los medios de comunicación utilizados en las placas de contacto para evitar cualquier efecto inhibitorio de los desinfectantes sobre el crecimiento de microorganismos.

#### **5. Aparato una cristalería**

Para conocer los requisitos generales, véase la norma ISO 7218

Aparato desechable es una alternativa aceptable a la cristalería reutilizable si tiene especificaciones similares.

Aparatos de laboratorio microbiológico habitual y, en particular, lo siguiente.

**5.1. Contacto placa**, plato de plástico con 65 mm de diámetro, lleno de un volumen controlado de medio de agar (elegido de acuerdo con los microorganismos diana), hecho especialmente para el muestreo de superficies.

Las placas varían en diámetro o área, de acuerdo con el tipo de superficie a muestrear. El agar deberá formar un menisco convexo con el plato.

**NOTA** También es Posible utilizar cualquier otro dispositivo (medio nutritivo en un flexible o rígido contenida), que permite el contacto con la superficie a muestrear, tal como un dipslide. (5,2).

**5.2. Dipslide**, (7 cm<sup>2</sup> a 10 cm<sup>2</sup>), uno o ambos lados de los cuales están cubiertos con una capa de medio de crecimiento sólido (escogido de acuerdo con los microorganismos diana).

**NOTA** Varios medios de cultivo están disponibles de acuerdo a los microorganismos buscados.

**5.3 Hisopo**, palillo rompible con algodón o material sintético (tal como alginato o rayón) hisopo contenida en un tubo o sobre.

El hisopo se envolvió y se esteriliza de forma individual. El material utilizado deberá ser documentada libre de sustancias inhibidoras.

**NOTA** Para algunos tipos de superficie, los residuos de algodón puede contaminar las partes internas de estas superficies después del muestreo.

**5.4 paño**, material tejido estéril húmedo, libre de Sustancia antimicrobiana, embalado individualmente en bolsas de plástico, que se utiliza para el muestreo de grandes superficies ( $\geq 100\text{cm}^2$ ).

**5.5 Esponja**, cuadrado estéril húmedo de esponja plana, libre de sustancia antimicrobiana, embalado individualmente en bolsas de plástico, que se utiliza para el muestreo de grandes superficies ( $\geq 100\text{cm}^2$ ).

**5.6 recipientes**, tales como botellas, frascos, tubos adecuados para la esterilización y el almacenamiento de medios de cultivo

**5.7 Cooler**, aislado, capaz de mantener la sencilla a un bajo temperatura durante su transporte al laboratorio.

**5.8 Pipetas graduadas**, que tiene aberturas de ancho y una capacidad nominal de 1 ml, graduadas en 0,1 ml divisiones o pipetas automáticas que entregan 100  $\mu\text{l}$  y 1000  $\mu\text{l}$ .

**5.9 Mixer**, para mezclar líquidos en tubos de cultivo.

**5.10 homogenizador** peristáltico mediante agitación horizontal, con las bolsas de plástico estériles para preparar suspensiones iniciales de movimiento peristáltico o movimiento de vibración (homogenizador usando agitación horizontal)

**5.11. Placas de Petri**, hechos de plástico, 65 mm de diámetro.

**5.12 Plantilla**, hecha de material resistente a la corrosión (por ejemplo, un marco de acero que encierra un área de  $20\text{cm}^2$  a  $100\text{cm}^2$ ), que es fácil de limpiar y se puede esterilizar.

## 6. Técnicas de Muestreo

### 6.1 Generalidades

Esto es importante que el laboratorio reciba una muestra que es representativa de la superficie ensayada y no ha sido cambiado durante el tiempo de contacto de desinfección 5 min. Espere a un periodo de conformidad con la especificación desinfectante antes de investigar la superficie con hisopos o placas de contacto para evaluar el rendimiento de la limpieza de un programa de desinfección (o de otra manera de acuerdo con la especificación del desinfectante).

Un neutralizador apropiado para todas las situaciones no se puede prescribir. Generalmente, monooleato de sorbitán (30 g / l) y lecitina (3 g / l) son útiles para los residuos de neutralización de desinfectantes absorbidos (por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario, amphotericides). El tiosulfato de sodio (5 g / l) es un buen neutralizante para productos a base de halógeno. En el caso de los desinfectantes a base de peróxido, catalasa o peroxidasa se pueden utilizar como neutralizar. Una unidad de estas enzimas cataliza la descomposición de  $1\mu\text{mol}$  de peróxido de hidrógeno

por minuto a 25 ° C ya un pH de 7,0 ± 0.2. Un número de neutralizadores desinfectantes se recomienda en la norma EN 1276, EN 1650, EN 13697, y al final 13704.

Los componentes de un neutralizador que se pueden utilizar en la mayoría de situaciones se dan en la tabla 1. Maquillaje en una solución de peptona (1 g / l) y una solución de cloruro de (8,5 g / l), distribuido en tubos o botellas, y esterilización por 15 min a 121 ° C.

**Table 1 — Neutralizer which can be used in most situations**

Component	Conc.
Sorbitan monooleate (Polysorbate 80)	30 g/l
Lecithin	3 g/l
Sodium thiosulfate	5 g/l
L-Histidine	1 g/l
Saponin	30 g/l

## 6.2 método de contacto de placa

Después de la eliminación de los contenedores de transporte, presione firmemente y sin ningún movimiento lateral contra la superficie de ensayo la superficie de agar de la placa de contacto o el deslizador. De la literatura se sabe que los resultados óptimos para placas de contacto se obtienen con un tiempo de contacto de 10 s y una presión obtenida con una masa de 500 g. Armario que en contacto con platos o laminocultivos inmediatamente después de la inoculación y se los puso de vuelta en el contenedor de transporte.

## 6.3 Hisopo o paño método / esponja

### 6.3.1 Método Hisopo

### 6.3 Hisopo o paño método / esponja

Saque un hisopo de la envoltura estéril y humedezca la punta sumergiéndolo en un tubo que contiene líquido de dilución. Presione la punta del hisopo contra la pared del tubo de eliminar el exceso de agua. Coloque la punta del hisopo en la superficie para ser investigado y raya un área estimada de 20 cm<sup>2</sup> a 100cm<sup>2</sup>, mientras que girar el hisopo entre el pulgar y el dedo índice en dos direcciones en ángulos rectos entre sí.

Ponga él hisopo en el tubo con líquido de dilución y descanso asépticamente o cortar el palo.

### 6.3.2 Método esponja / tela

Abra la bolsa de plástico que contiene o el paño o una esponja.

Retirar de forma aséptica el paño o una esponja con una pinza estéril o una mano con guantes estériles. Humedezca el paño o una esponja con la cantidad suficiente de diluyente (sin exceso). En el caso de superficies húmedas, esto no es necesario.

Devuelva el paño o esponja a la bolsa de plástico y cerrarla en forma que asegure ninguna fuga.

La Muestra la superficie elegida se cogerá la muestra en dos direcciones perpendiculares, cambiando la cara de la tela o esponja. Coloque el paño o una esponja en el recipiente estéril, añadir el diluyente y se cierra. Añadir un volumen conocido y suficiente de diluyente, de modo que el paño o esponja esté todavía húmedo en el análisis.

Alternativamente, abra la bolsa de plástico que contiene el paño o una esponja. Agarrando la esponja a través de la bolsa, saque la bolsa invertido más de la mano. Utilice la esponja para recoger la muestra como se ha descrito

anteriormente y transferir el paño o una esponja para una bolsa de plástico estéril. Guardar la bolsa de una manera que asegure ninguna fuga.

## **7. Transporte**

El transporte de las muestras obtenidas con el método de hisopo, preferiblemente dentro de 4 h, a una caja fría fijado en 1 ° C a 4 ° C. Examinar en el laboratorio tan pronto como sea posible y no a más tardar 24 horas, tal como se describe en la cláusula 8.

El transporte de las placas y / o láminas de cultivos de contacto, preferiblemente dentro de 4 h, de una manera que no se produzca ninguna contaminación.

## **8. Procedimiento**

### **8.1. Método de contacto placa**

Se incuban las placas de contacto o láminas de cultivos según el tipo de microorganismos que se enumeran (véase la Nota a la cláusula 4).

El método de la placa de contacto no se utiliza para la detección específica de microorganismos patógenos.

### **8.2 método Hisopo (incluyendo tela y esponja)**

Mezclar bien los hisopos que contienen usando un mezclador (5.9) durante 30 s, el ajuste de la velocidad de manera que la pared de la Tuve se humedece hasta la altura de 2 cm a 3 cm por debajo de la parte superior.

Añadir a las bolsas de plástico que contienen paños o esponjas una cantidad de fluido de dilución o neutralizantes de fluido (4.1) en función del tamaño de la zona investigado (por ejemplo 100 ml de 100cm<sup>2</sup>). Entonces el tratamiento de los contenidos de las bolsas en un homogeneizador peristáltico (5,10) durante 1 min, o un homogeneizador usando agitación horizontal (5.10) durante 30 s. Esto representa la suspensión inicial.

Si se espera que un gran número de microorganismos, preparar otras diluciones decimales en peptona agua de dilución para obtener el número numerable de colonias (véase la norma ISO 6887-1).

De acuerdo con los métodos de enumeración utilizados (ver apropiados Standars Internacionales), inocular placas duplicadas de los medios de comunicación con la suspensión inicial, usando 1 ml de inóculo de cuatro placas y verter 0,1 ml de inóculo para las técnicas de propagación de placa. Trate cualquier diluciones adicionales de la misma manera. Invierta los platos y se incuban las placas durante el tiempo y Temperatura adecuada para cada medio.

Como una alternativa a la técnica de siembra descrita anteriormente, es posible utilizar el método de la incorporación de la placa. A partir de la dilución más alta, utilizar pipetas estériles para transferir alícuotas de 0.05ml de las suspensiones iniciales (hisopos, trapos o esponjas) y de las diluciones adicionales a los sectores apropiados del medio de cultivo marcado en la parte inferior de la placa de agar (por duplicado, utilizando las mismas diluciones para diferentes placas de agar). Cada placa de agar pre secado se puede utilizar para gotas de no más de seis diluciones diferentes. Utilice la técnica de pipeteo inverso al presionar el émbolo completamente en la elaboración de la parte alícuota de 0,05 ml, e inocular las placas presionando el émbolo para sólo la primera parada. Mantenga las placas de agar horizontal (superiores tapa) hasta que la superficie esté seca.

Si el método de hisopo se utiliza para demostrar la presencia de microorganismos específicos (por ejemplo, *Listeria monocytogenes* o *Salmonella* spp.), El área investigada debe ser al menos 100cm<sup>2</sup> y preferible sobre 1000cm<sup>2</sup>. Transferir el hisopo, paño o una esponja para el caldo de enriquecimiento apropiado y mezclar bien.

### **8.3 Conteo y detección de colonias**

#### **8.3.1. Método de contacto placa**

Contar el número de colonias típicas en las placas de contacto o láminas de cultivos directamente después de que el periodo de incubación indicado y confirmar estos, si es necesario, según los microorganismos buscados.

### 8.3.2 método Hisopo (incluyendo paño o una esponja)

Contar las colonias en cada plato y confirmar estos, si es necesario, de acuerdo con los microorganismos buscados.

### 8.3.3 método de incorporación en placa

Contar el número de colonias (destino) a las diluciones rendimiento de 5 a 50 colonias.

### 8.3.4. Procedimientos de enriquecimiento

Después de la pre-enriquecimiento, siga las instrucciones de acuerdo a los microorganismos buscados.

## 9. Expresión de los resultados y cálculo

Advertencia - Desde el método de la placa de contacto y hisopo método / tela no suelen dar el mismo resultado, es necesario señalar en el informe que el método se ha utilizado.

### 9.1. Método de contacto placa

Divida te número de colonias características por el área de superficie de la placa. Reporte el recuento como el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por centímetro cuadrado de superficie.

### 9.2 método Hisopo (incluyendo tela y esponja)

9.2.1 Calcular el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de suspensión inicial. Como se describe en la norma internacional pertinente.

9.2.2 Calcular el número de UFC por centímetro cuadrado de superficie investigado, NS, utilizando la fórmula

$$N_S = \frac{N \times F}{A} \times D$$

where

*N* is the number of CFU in 1 ml of dilution liquid (or neutralizing liquid);

*F* is the amount, in millilitres, of dilution fluid (or neutralizing liquid) in the tube or homogenizer bag;

*A* is the surface investigated, in square centimetres;

*D* is the reciprocal of the dilution used.

9.2.3 For the drop-plate method, calculate the number, *N*, of CFU per millilitre of suspension fluid, using the formula

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n_1 + 0.5n_2) d}$$

where

$\Sigma C$  is the sum of the colonies counted on all the drops retained from two successive dilutions, at least one of which contains 5 colonies;

*V* is the volume of inoculum applied in each drop (in this case 50  $\mu$ l);

*n*<sub>1</sub> is the number of drops retained at the first dilution;

*n*<sub>2</sub> is the number of drops retained at the second dilution;

*d* is the dilution factor corresponding to the first dilution retained.

To obtain the count per square centimetre of surface, use the formula

$$N_S = \frac{N \times F}{A}$$

where

*F* is the volume, in millilitres, of dilution fluid (or neutralizing liquid) in the tube or homogenizer bag;

*A* is the area swabbed, in square centimetres.

9.2.4 Si el área hisopada no se ha definido, para calcular el número de UFC por hisopo,  $N_{SW}$ , utilice la fórmula

Cuando se utilizan métodos semi-cuantitativos, los resultados obtenidos en UFC por centímetro cuadrado de superficie se pueden administrar como los llamados puntuaciones de higiene. Como estos resultados pueden variar ampliamente dependiendo de las superficies analizadas, se recomienda que sean designados y acordados entre las partes interesadas.

9.2.5 En el caso de los procedimientos de enriquecimiento, el informe del microorganismo objetivo detectada o no detectada en el área hisopada, o por hisopo si el área no se conoce.

**Anexo 4. RM- N° 461-2007/MINSA Guía Técnica para el Análisis Microbiológico de superficies en contacto con Alimentos y Bebidas.**

El Peruano  
Lima, jueves 7 de junio de 2007

**NORMAS LEGALES**

**346583**

como Jefe del Instituto de Desarrollo de Recursos Humanos, por las razones expuestas en la parte considerativa de la presente Resolución, dándosele las gracias por los servicios prestados.

**ALAN GARCÍA PÉREZ**  
Presidente Constitucional de la República

**Aprueban "Guía Técnica para el Análisis Microbiológico de Superficies en contacto con Alimentos y Bebidas"**

**RESOLUCIÓN MINISTERIAL  
N° 461-2007/MINSA**

Lima, 5 de junio del 2007

Visto: el Expediente N° 06-066910-001, que contiene el Memorandum N° 8358-2006-DG/DIGESA, presentado por la Dirección General de Salud Ambiental;

**CONSIDERANDO:**

Que, el Artículo 92° de la Ley N° 26842, Ley General de Salud dispone que la Autoridad de Salud de nivel nacional es la encargada del control sanitario de los alimentos y bebidas;

Que, el Artículo 2° del Reglamento sobre Vigilancia y Control Sanitario de Alimentos y Bebidas, aprobado por Decreto Supremo N° 007-98-SA dispone que todo alimento y bebida o materia prima debe responder a sus caracteres organolépticos, composición química y condiciones microbiológicas;

Que, mediante Resolución Ministerial N° 410-2006/MINSA del 2 de mayo de 2006, dispuso que la Oficina General de Comunicaciones publique en el portal de internet del Ministerio de Salud, hasta por un periodo de treinta (30) días naturales, el proyecto de la Guía Técnica sobre Criterios y Procedimientos para el Examen Microbiológico de Superficies en relación con Alimentos y Bebidas, para recepcionar las sugerencias o recomendaciones que pudieran contribuir a su perfeccionamiento;

Que, habiendo culminado dicho plazo, el grupo técnico conformado por representantes de las Direcciones de Salud, Centro Nacional de Alimentación y Nutrición del Instituto Nacional de Salud, Certificaciones del Perú y Laboratorios acreditados, han evaluado y consolidado las sugerencias o recomendaciones presentadas por los recurrentes;

Que, el citado proyecto de Guía Técnica, propone regular un aspecto técnico normativo, estandarizando y uniformizando los procedimientos que se deben aplicar en la selección, toma de muestras y ensayos microbiológicos, estableciendo los límites microbiológicos destinados a evaluar las condiciones higiénicas sanitarias de las superficies vivas e inertes que entran en contacto con los alimentos y bebidas;

Con la opinión favorable de la Dirección General de Salud Ambiental;

Con el visado del Viceministro de Salud, la Directora General de Salud Ambiental y el Director General de la Oficina General de Asesoría Jurídica; y,

De conformidad con lo previsto en el Artículo 8° literal f) de la Ley N° 27657, Ley del Ministerio de Salud;

**SE RESUELVE:**

**Artículo 1°.-** Aprobar la "Guía Técnica para el Análisis Microbiológico de Superficies en contacto con Alimentos y Bebidas", que consta catorce (14) folios y que forma parte integrante de la presente resolución.

**Artículo 2°.-** La Oficina General de Comunicaciones publicará la mencionada Guía Técnica en el Portal del Internet del Ministerio de Salud.

Regístrese, comuníquese y publíquese.

**CARLOS VALLEJOS SOLOGUREN**  
Ministro de Salud

69199-1

**Aprueban Documento Técnico: Plan Nacional de Prevención y Control de la Transmisión Madre Niño del VIH y Sífilis**

**RESOLUCIÓN MINISTERIAL  
N° 463-2007/MINSA**

Lima, 5 de junio del 2007

Visto: el Expediente N° 07-043201-DGSP/MINSA;

**CONSIDERANDO:**

## GUÍA TÉCNICA PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE SUPERFICIES EN CONTACTO CON ALIMENTOS Y BEBIDAS

### 1. Finalidad

La presente Guía Técnica tiene por finalidad contribuir a asegurar la calidad sanitaria indispensable en la fabricación, elaboración y expendio de alimentos y bebidas destinados al consumo humano y a la implementación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (HACCP: Hazard Analysis and Critical Control Points).

### 2. Objetivos

2.1. Uniformizar los procedimientos que se deben aplicar en la selección, toma de muestras y para los análisis microbiológicos de superficies vivas e inertes.

2.2. Establecer los límites microbiológicos para evaluar las condiciones higiénicas sanitarias de las superficies vivas e inertes que entran en contacto con los alimentos y bebidas.

2.3. Proporcionar a la Autoridad Sanitaria un instrumento para evaluar la efectividad de los Programas de Higiene y Saneamiento (PHS) y de Buenas Prácticas de Higiene en la manipulación de los alimentos.

### 3. Ámbito de aplicación

La presente Guía Técnica es de obligatorio cumplimiento en todo el territorio nacional, para efectos de vigilancia y control sanitario por parte de la Autoridad Sanitaria, según el ámbito de su competencia. Asimismo, la presente Guía Técnica podrá ser utilizada referencialmente por personas naturales o personas jurídicas en las operaciones de control sanitario que realicen.

### 4. Procedimientos a estandarizar

La presente Guía Técnica estandariza los procedimientos para la selección, toma de muestras y análisis microbiológicos; y establece los límites microbiológicos para superficies que están en contacto o relación directa con los alimentos.

### 5. Definiciones Operativas

**Análisis microbiológico:** Procedimiento que se sigue para determinar la presencia, identificación, y cantidad de microorganismos patógenos e indicadores de contaminación en una muestra.

**Calidad sanitaria:** Es el conjunto de requisitos microbiológicos, físico-químicos y organolépticos que debe cumplir un alimento para ser considerado inocuo y apto para el consumo humano.

**Límites microbiológicos:** Son los valores permisibles de microorganismos presentes en una muestra, que indican la aceptabilidad higiénico sanitaria de una superficie.

**Gel refrigerante:** Producto acumulador de frío, de descongelamiento retardado, no tóxico, no comestible y reutilizable que se emplea para mantener la cadena de frío.

**Hisopo:** Instrumento que tiene un extremo recubierto de algodón o de rayón estéril que se utiliza humedecido con solución diluyente para facilitar la recuperación bacteriana, en el muestreo de superficies.

**Manipulador de alimentos:** Toda persona que a través de sus manos toma contacto directo con alimentos envasados o no envasados, equipos y utensilios utilizados para su elaboración y preparación o con superficies que están en contacto con los alimentos.

**Peligro:** Agente biológico, químico o físico presente en un alimento o superficie que está en contacto con los alimentos y que pueden ocasionar un efecto nocivo para la salud.

**Riesgo:** Probabilidad de que ocurra un efecto nocivo para la salud y la gravedad de dicho efecto, como consecuencia de un peligro o peligros en los alimentos, ocasionado por el contacto con superficies vivas (manipulación) o inertes contaminadas.

**Superficies inertes:** Son todas las partes externas y/o internas de los utensilios que están en contacto con los alimentos, por ejemplo equipos, mobiliario, vajilla, cubiertos, tabla de picar, etc.

**Superficies vivas:** Las partes externas del cuerpo humano que entran en contacto con el equipo, utensilios y alimentos durante su preparación y consumo. Para efectos de la presente Guía se considera a las manos con o sin guantes del manipulador de alimentos.

**Vigilancia sanitaria:** Conjunto de actividades de observación y evaluación que realiza la Autoridad Sanitaria sobre las condiciones sanitarias de las superficies que están en contacto con los alimentos y bebidas, en protección de la salud de los consumidores.

## **6. Conceptos Básicos**

### **6.1. Operaciones en campo**

Las operaciones en campo son aquellas que se realizan en el establecimiento donde se procesan, elaboran, almacenan, fraccionan o expenden alimentos y bebidas, sea fábrica, almacén, servicios de alimentos, quiosco, puesto, comedor, u otro.

Comprende las siguientes operaciones consecutivas, realizadas por personal capacitado en la materia:

- a. Procedimiento para la selección de la muestra.
- b. Selección del método de muestreo.
- c. Procedimiento para la toma de muestra.

### **6.2. Operaciones analíticas**

Las operaciones analíticas son aquellas que se realizan en un laboratorio destinado y acondicionado para el control de la calidad sanitaria e inocuidad de los alimentos y bebidas.

Comprende las siguientes operaciones consecutivas, realizadas por personal capacitado en la materia:

- a. Determinación de los ensayos microbiológicos.
- b. Procedimiento de análisis microbiológicos.
- c. Cálculo y expresión de resultados.
- d. Interpretación de resultados de acuerdo a los límites microbiológicos.

## **7. Consideraciones Específicas: Operaciones en Campo**

### **7.1. Procedimiento para la selección de la muestra**

El procedimiento para seleccionar las muestras, debe estar en función de los riesgos sanitarios relacionados a las diferentes etapas de la cadena alimentaria, sea la de fabricación, la de elaboración y/o expendio.

#### **En fábricas de alimentos y bebidas**

##### **a) Superficies inertes**

Se seleccionarán aquellas que están o tendrán contacto directo con los alimentos que no serán sometidos a un proceso térmico posterior u otro que disminuya la carga microbiana.

- b) **Superficies vivas**  
Se seleccionarán a los manipuladores de alimentos, con o sin guantes, que estén en contacto directo con los alimentos que no serán sometidos a un proceso térmico posterior u otro tratamiento que disminuya la carga microbiana.

**En establecimientos de elaboración y expendio**

- a) **Superficies inertes**  
Se seleccionarán aquellas superficies que están en contacto con los alimentos destinados al consumo directo, como utensilios, vajilla, superficies de corte, menaje, equipos, entre otros.
- b) **Superficies vivas**  
Se seleccionarán las manos de los manipuladores, con o sin guantes, que estén en contacto con los alimentos destinados al consumo directo.

**7.2. Selección del método de muestreo**

La selección del método de muestreo debe estar en función de las características de la superficie a muestrear.

MÉTODO DE MUESTREO	SUPERFICIES A MUESTREAR
<b>Método del Hisopo</b>	Se utiliza para superficies inertes regulares e irregulares, tales como tabla de picar, bandejas, mesas de trabajo, utensilios, cuchillas de equipos, cortadora de embutidos, cortadora de pan de molde, fajas transportadoras, tolvas, mezcladoras, pisos, paredes y otros.
<b>Método de la Esponja</b>	El método de la esponja se utiliza preferentemente para muestrear superficies de mayor área.
<b>Método del Enjuague</b>	Se utiliza para superficies vivas (manos) y para objetos pequeños o para el muestreo de superficies interiores de envases, botellas, bolsas de plástico, etc.

**7.3. Procedimiento para la toma de muestra**

**7.3.1. Método del hisopo**

- a) **Descripción:**  
Consiste en frotar con un hisopo estéril previamente humedecido en una solución diluyente, el área determinada en el muestreo.
- b) **Materiales:**
- o Hisopos de algodón u otro material equivalente, de largo aproximado de 12 cm.
  - o Tubo de ensayo con tapa hermética conteniendo 10 mL de solución diluyente estéril. Se agregará una solución diluyente con neutralizante como alternativa. (Ver Anexo 1).
  - o Plantilla estéril, con un área abierta en el centro de 100 cm<sup>2</sup> (10cm x 10cm) o alternativamente, plantilla estéril, con un área abierta en el centro de 25 cm<sup>2</sup> (5 cm x 5 cm).
  - o Guantes descartables de primer uso.
  - o Protector de cabello.

- Mascarillas descartables.
- Plumón marcador indeleble (para vidrio).
- Caja térmica.
- Refrigerantes.

**c) Procedimiento:**

1. Colocar la plantilla (10cm x 10cm) sobre la superficie a muestrear.
2. Humedecer el hisopo en la solución diluyente y presionar ligeramente en la pared del tubo con un movimiento de rotación para quitar el exceso de solución.
3. Con el hisopo inclinado en un ángulo de 30°, frotar 4 veces la superficie delimitada por la plantilla, cada una en dirección opuesta a la anterior. Asegurar el hisopado en toda la superficie.
4. En el caso de utilizar la plantilla de 5cm x 5cm, repetir esta operación 3 veces más, en lugares diferentes de la misma superficie, para obtener 100 cm<sup>2</sup>.
5. Colocar el hisopo en el tubo con la solución diluyente, quebrando la parte del hisopo que estuvo en contacto con los dedos del muestreador, la cual debe ser eliminada.
6. Para superficies irregulares, en el caso de utensilios, se repetirá la operación con 3 utensilios más (total 4 como máximo), con el mismo hisopo, considerando el área que está en contacto con el alimento o con la boca.
7. Si no se toman las 4 muestras, se debe anotar en la Ficha de Toma de Muestra.

**d) Conservación y Transporte de la muestra**

Las muestras se colocarán en un contenedor isotérmico con gel refrigerante, el cual se distribuirá uniformemente en la base y en los laterales, para asegurar que la temperatura del contenedor no sea mayor de 10°C, a fin de asegurar la vida útil de la muestra hasta su llegada al laboratorio. El tiempo de transporte entre la toma de muestra y la recepción en el laboratorio estará en función estricta de dicha temperatura, no debiendo exceder las 24 horas y excepcionalmente las 36 horas.

Se deberá registrar la temperatura del contenedor al colocar las muestras y a la llegada al laboratorio con la finalidad de asegurar que las mismas hayan sido transportadas a la temperatura indicada. Las temperaturas superiores a 10°C invalidan la muestra para su análisis.

### 7.3.2. Método de la esponja

**a) Descripción:**

Consiste en frotar con una esponja estéril, previamente humedecida en una solución diluyente, el área determinada en el muestreo.

**b) Materiales:**

- Esponja estéril de poliuretano o de celulosa, de 5cm x 5 cm.
- Plantilla estéril, con un área en el centro de 100 cm<sup>2</sup> (10 cm x 10 cm).
- Frascos con tapa rosca de 250 mL de capacidad, con 100 mL de solución diluyente estéril.
- Pinzas estériles.
- Bolsas de polietileno de primer uso.
- Guantes descartables de primer uso.
- Protector de cabello.
- Mascarillas descartables.
- Plumón marcador indeleble (para vidrio).
- Caja térmica.
- Refrigerantes.

**c) Procedimiento:**

1. Retirar la esponja de su envoltura con la pinza estéril o con guantes descartables o bien usar una bolsa de primer uso, invertida a manera de guante.
2. Humedecer la esponja con la solución diluyente estéril (aproximadamente 10 mL).

3. En condiciones asépticas frotar vigorosamente el área a muestrear. En el caso de superficies regulares, frotar el área delimitada por la plantilla y en las superficies irregulares (cuchillas, equipos, utensilios, etc), frotar abarcando la mayor cantidad de superficie.
4. Colocar la esponja en el frasco con el resto de la solución diluyente o alternativamente colocar la esponja con la muestra en una bolsa de plástico de primer uso.
5. Para el caso específico de utensilios se deberá repetir la operación con 3 utensilios más (total 4 como máximo), con la misma esponja, considerando el área que está en contacto con el alimento o con la boca.
6. Las tazas, copas o vasos se muestrearán 2 a 3 cm alrededor del borde por dentro y por fuera.

**d) Conservación y Transporte de la muestra**

Las muestras se colocarán en un contenedor isotérmico con gel refrigerante, el cual se distribuirá uniformemente en la base y en los laterales, para asegurar que la temperatura del contenedor no sea mayor de 10°C, a fin de asegurar la vida útil de la muestra hasta su llegada al laboratorio. El tiempo de transporte entre la toma de muestra y la recepción en el laboratorio estará en función estricta de dicha temperatura, no debiendo exceder las 24 horas y excepcionalmente las 36 horas.

Se deberá registrar la temperatura del contenedor al colocar las muestras y a la llegada al laboratorio con la finalidad de asegurar que las mismas hayan sido transportadas a la temperatura indicada. Las temperaturas superiores a 10 °C invalidan la muestra para su análisis.

**7.3.3. Método del enjuague**

**a) Descripción:**

Dependiendo de la muestra, el método consiste en realizar un enjuague (botellas, frascos, utensilios, similares) o inmersión (manos, objetos pequeños) en una solución diluyente.

**b) Materiales:**

- o Frascos con tapa hermética de boca ancha de 250 mL de capacidad, con 100 mL de solución diluyente estéril.
- o Bolsas de polietileno de primer uso.
- o Pinzas estériles.
- o Guantes descartables de primer uso.
- o Protector de cabello.
- o Mascarillas descartables.
- o Plumón marcador indeleble (para vidrio).
- o Caja térmica.
- o Refrigerantes.

**c) Procedimiento:**

**Para manos**

1. Vaciar el diluyente del frasco (100 mL) en una bolsa plástica de primer uso.
2. Introducir las manos a muestrear hasta la altura de la muñeca.
3. Solicitar al manipulador que realice un frotado de los dedos y particularmente alrededor de las uñas y la palma de la mano, adicionalmente el muestreador deberá realizar la misma operación a través de las paredes de la bolsa, durante un (01) minuto aproximadamente.
4. Luego de retirar las manos se regresa el líquido al frasco o se anuda la bolsa y ésta se coloca en otra bolsa para que esté segura; en este caso, la bolsa que se utilice debe ser estéril.

**Para recipientes (frascos, jarras, otros)**

1. Vaciar en el recipiente a muestrear una parte de la solución estéril (frasco con 100 mL) y agitar vigorosamente.
2. Regresar la solución a su frasco original.
3. Cerrar herméticamente el frasco para su traslado.

**Para objetos pequeños (piezas de equipos, otros)**

1. Se introduce individualmente cada objeto en el frasco o bolsa con la solución estéril y agitar vigorosamente.
2. Luego con una pinza estéril, retirar el objeto pequeño del frasco o bolsa.
3. Si se muestrea más de un objeto pequeño de igual naturaleza, se debe considerar esto en el cálculo de resultados a fin de evitar reportes inexactos.

**d) Conservación y Transporte de la muestra**

Las muestras se colocarán en un contenedor isotérmico con gel refrigerante, el cual se distribuirá uniformemente en la base y en los laterales, para asegurar que la temperatura del contenedor no sea mayor de 10°C, a fin de asegurar la vida útil de la muestra hasta su llegada al laboratorio. El tiempo de transporte entre la toma de muestra y la recepción en el laboratorio estará en función estricta de dicha temperatura, no debiendo exceder las 24 horas y excepcionalmente las 36 horas.

Se deberá registrar la temperatura del contenedor al colocar las muestras y a la llegada al laboratorio con la finalidad de asegurar que las mismas hayan sido transportadas a la temperatura indicada. Las temperaturas superiores a 10°C invalidan la muestra para su análisis.

**8. Consideraciones Específicas: Operaciones Analíticas**

**8.1. Selección de ensayos**

Los ensayos a realizar serán según el tipo de superficie que ha sido muestreada.

ENSAYOS	SUPERFICIES VIVAS	SUPERFICIES INERTES
Indicadores de Higiene	Coliformes totales	Coliformes totales
	<i>Staphylococcus aureus</i> (*)	—

(\*) En el caso de superficies el *S. aureus* es considerado un indicador de higiene ya que la toxina es generada en el alimento.

Se considerará la búsqueda de patógenos tales como: *Salmonella* sp., *Listeria* sp., *Vibrio cholerae*, en caso signifiquen un peligro para el proceso. Para la detección de patógenos se deberá tomar una muestra diferente (de la misma superficie) a la muestreada para indicadores de higiene.

**8.2. Procedimiento para el control microbiológico con aplicación del método del hisopo**

**Procedimiento de análisis microbiológicos**

Sea por métodos rápidos o convencionales, los ensayos microbiológicos se realizarán utilizando métodos normalizados por organismos internacionales como la Organización Internacional para la Estandarización (ISO: Internacional Organization for Standardization), Métodos Oficiales de Análisis de la Asociación Internacional de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC: Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International), Administración de Alimentos y Drogas/Manual Analítico Bacteriológico (FDA/BAM: Food and Drug Administration/Bacteriological

Analytical Manual), Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF: Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods), Asociación Americana para la Salud Pública / Compendio de Métodos para el Análisis Microbiológico de Alimentos (APHA/CMMEF: American Public Health Association / Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods), entre otros; utilizando la técnica de recuento en placa.

**Cálculo y expresión de resultados**

**a) Cálculo**

Para superficies regulares: el número de colonias obtenidas (ufc) se multiplicará por el factor de dilución y por el volumen de solución diluyente utilizada en el muestreo (10 mL) y se dividirá entre el área de la superficie hisopada o muestreada (100 cm<sup>2</sup>).

Para superficies irregulares: el número de colonias obtenido (ufc) se multiplicará por el factor de dilución y por el volumen de la solución diluyente usada.

**b) Expresión de resultados**

Los resultados se expresarán:

- Para superficies regulares en: ufc / cm<sup>2</sup>;
- Para superficies irregulares en: ufc/ superficie muestreada (ej. cuchilla de licuadora, cuchara, etc.). Se deberá expresar la cantidad de superficies muestreadas. (ej. ufc/ 4 cucharas).

**c) Interpretación de resultados de acuerdo a los límites microbiológicos**

SUPERFICIES INERTES				
MÉTODO HISOPO	Superficie Regular		Superficie Irregular	
ENSAYO	Límite de Detección del Método	Límite Permisible (*)	Límite de Detección del Método	Límite Permisible (*)
Coliformes totales	< 0,1 ufc / cm <sup>2</sup>	< 1 ufc / cm <sup>2</sup>	< 10 ufc / superficie muestreada	< 10 ufc / superficie muestreada
Patógeno	Ausencia / superficie muestreada en cm <sup>2</sup> (**)	Ausencia / superficie muestreada en cm <sup>2</sup> (**)	Ausencia / superficie muestreada	Ausencia / superficie muestreada

(\*) En las operaciones analíticas, estos valores son indicadores de ausencia.

(\*\*) Indicar el área muestreada, la cual debe ser mayor o igual a 100 cm<sup>2</sup>.

**8.3. Procedimiento para el control microbiológico con aplicación del método de la esponja**

**Procedimiento de análisis microbiológico**

Sea por métodos rápidos o convencionales, los ensayos microbiológicos se realizarán utilizando métodos normalizados por organismos internacionales como la ISO, AOAC, FDA/BAM, ICMSF, APHA/CMMEF, entre otros; utilizando la técnica de recuento en placa.

**Cálculo y expresión de resultados**

**a) Cálculo**

Para superficies regulares: el número de colonias obtenidas (ufc) se multiplicará por el factor de dilución y por el volumen de solución diluyente utilizada en el muestreo (100 mL) y se dividirá entre el área de la superficie muestreada (100 cm<sup>2</sup>).

Para superficies irregulares: el número de colonias obtenido (ufc) se multiplica por el factor de dilución y por el volumen de solución diluyente utilizado en el muestreo (100 mL) y se divide entre las 4 superficies muestreadas (ej. cuchillas de licuadoras, utensilios como cucharas, vasos, etc.).

**b) Expresión de resultados**

Los resultados se expresarán:

- Para superficies regulares: ufc/ cm<sup>2</sup>
- Para superficies irregulares: ufc/ superficie muestreada (ej. cuchilla de licuadora, cubierto, etc).

**c) Interpretación de resultados de acuerdo a los límites microbiológicos**

SUPERFICIES INERTES				
MÉTODO ESPONJA	Superficie Regular		Superficie Irregular	
ENSAYO	Límite de Detección del Método	Límite Permisible (*)	Límite de Detección del Método	Límite Permisible (*)
Coliformes totales	< 1 ufc / cm <sup>2</sup>	< 1 ufc / cm <sup>2</sup>	< 25 ufc / superficie muestreada (**)	< 25 ufc / superficie muestreada (**)
Patógeno	Ausencia / superficie muestreada en cm <sup>2</sup> (***)	Ausencia / superficie muestreada en cm <sup>2</sup> (***)	Ausencia / superficie muestreada	Ausencia / superficie muestreada

(\*) En las operaciones analíticas, estos valores son indicadores de ausencia.

(\*\*) Para 4 utensilios.

(\*\*\*) Indicar el área muestreada, la cual debe ser mayor o igual a 100 cm<sup>2</sup>.

**8.4. Procedimiento para el control microbiológico con aplicación del método del enjuague**

**Procedimiento de análisis microbiológico**

Sea por métodos rápidos o convencionales, los ensayos microbiológicos se realizarán utilizando métodos normalizados por organismos internacionales como la ISO, AOAC, FDA/BAM, ICMSF, APHA/CMMEF, entre otros; utilizando la técnica de recuento en placa.

**Cálculo y expresión de resultados**

**a) Cálculo**

Para superficies vivas: el número de colonias obtenidas (ufc) se multiplicará por el factor de dilución y por el volumen de solución diluyente utilizada en el muestreo (100 mL).

Para objetos pequeños o para el muestreo de superficies interiores de envases, botellas, bolsas de plástico, entre otros, el número de colonias obtenido (ufc) se multiplica por el factor de dilución y por el volumen de solución diluyente utilizado en el muestreo (100 mL) y se divide entre las 4 superficies muestreadas (ej. envases, bolsas de plástico).

**b) Expresión de resultados**

Los resultados se expresarán:

- Para superficies vivas: ufc/ manos.
- Para superficies internas: ufc/ superficie muestreada (ej. envases, bolsas de plástico, etc).

**c) Interpretación de resultados de acuerdo a los límites microbiológicos**

SUPERFICIES				
MÉTODO ENJUAGUE	Vivas		Pequeñas o Internas	
ENSAYO	Límite de Detección del Método	Límite Permisible (*)	Límite de Detección del Método	Límite Permisible (*)
Coliformes totales	< 100 ufc / manos	< 100 ufc / manos	< 25 ufc / superficie muestreada (**)	< 25 ufc / superficie muestreada (**)
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 100 ufc / manos	< 100 ufc / manos	--	--
Patógeno	Ausencia / manos	Ausencia / manos	Ausencia / superficie muestreada	Ausencia / superficie muestreada

(\*) En las operaciones analíticas, estos valores son indicadores de ausencia.

(\*\*) Para 4 utensilios.

### Anexo 5. Registros de monitoreo microbiológico ambiental.



<b>LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA</b> CALLAO <input checked="" type="checkbox"/> CHIMBOTE <input type="checkbox"/> PIURA <input type="checkbox"/>	<b>MONITOREO MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL</b>
--	---

Fecha de inicio: 13-10-01

Fecha de término: 13-10-06

Medios usados: PC Lote: 125

OGY Lote: 127

MICROORGANISMO	SECCION	RESULTADO UFC/15 min	
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de siembra	Mesa 1	3
MOHOS Y LEVADURAS			4
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de siembra	Mesa 2	2
MOHOS Y LEVADURAS			3
AEROBIOS MESOFILOS		Mesa 3	3
MOHOS Y LEVADURAS			4
AEROBIOS MESOFILOS		Mesa 4	2
MOHOS Y LEVADURAS			1
AEROBIOS MESOFILOS		Mesa 5	3
MOHOS Y LEVADURAS			5
AEROBIOS MESOFILOS		Cabinas de flujo laminar	0
MOHOS Y LEVADURAS			0
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de pases	Mesa 1	3
MOHOS Y LEVADURAS			5
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de pases	Mesa 2	3
MOHOS Y LEVADURAS			5
AEROBIOS MESOFILOS			
MOHOS Y LEVADURAS			
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de preparación de medios de cultivo		7
MOHOS Y LEVADURAS			2
AEROBIOS MESOFILOS			
MOHOS Y LEVADURAS			
AEROBIOS MESOFILOS			
MOHOS Y LEVADURAS			
AEROBIOS MESOFILOS			
MOHOS Y LEVADURAS			
AEROBIOS MESOFILOS			
MOHOS Y LEVADURAS			

Observaciones:  
 Bacterias aerobias mesófilas viables  $\leq 15$  UFC/placa/15min; Mohos y levaduras  $\leq 15$  UFC/placa/15min

ANALISTA RESPONSABLE

V\*B\* JEFE DE SECCIÓN/SUPERVISOR

LE-R-MAM  
 Versión 02  
 2010-06-14

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CALLAO CHIMBOTE PIURA	MONITOREO MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL
---	------------------------------------

Fecha de inicio: 13-10-03

Fecha de término: 13-10-12

Medios usados: PC Lote: 150


OGY Lote: 153

MICROORGANISMO	SECCION	RESULTADO UFC/15 min	
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de siembra	Mesa 1	4
MOHOS Y LEVADURAS			4
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de siembra	Mesa 2	3
MOHOS Y LEVADURAS			3
AEROBIOS MESOFILOS		Mesa 3	2
MOHOS Y LEVADURAS			1
AEROBIOS MESOFILOS		Mesa 4	7
MOHOS Y LEVADURAS			4
AEROBIOS MESOFILOS		Mesa 5	5
MOHOS Y LEVADURAS			3
AEROBIOS MESOFILOS		Cubina de flujo laminar	0
MOHOS Y LEVADURAS			0
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de pases	Mesa 1	7
MOHOS Y LEVADURAS			6
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de pases	Mesa 2	5
MOHOS Y LEVADURAS			4
AEROBIOS MESOFILOS			
MOHOS Y LEVADURAS			
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de preparación de medios de cultivo		3
MOHOS Y LEVADURAS			2
AEROBIOS MESOFILOS			
MOHOS Y LEVADURAS			
AEROBIOS MESOFILOS			
MOHOS Y LEVADURAS			
AEROBIOS MESOFILOS			
MOHOS Y LEVADURAS			
AEROBIOS MESOFILOS			
MOHOS Y LEVADURAS			

Observaciones:

Bacterias aerobias mesófilas viables  $\leq 15$  UFC/placa/15min; Mohos y levaduras  $\leq 15$  UFC/placa/15min

  
ANALISTA RESPONSABLE

  
V.B. JEFE DE SECCIÓN SUPERVISOR

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CALLAO <input type="checkbox"/> CHIMBOTE <input type="checkbox"/> PIURA <input type="checkbox"/>	MONITOREO MICROBIOLOGICO AMBIENTAL
--	------------------------------------

Fecha de inicio: 13-10-14

Fecha de término: 13-10-19

Medios usados: PC Lote: 258


OGY Lote: 300

MICROORGANISMO	SECCION	RESULTADO UFC/15 min	
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de siembra	Mesa 1	3
MOHOS Y LEVADURAS			2
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de siembra	Mesa 2	3
MOHOS Y LEVADURAS			3
AEROBIOS MESOFILOS		Mesa 3	4
MOHOS Y LEVADURAS			2
AEROBIOS MESOFILOS		Mesa 4	5
MOHOS Y LEVADURAS			3
AEROBIOS MESOFILOS		Mesa 5	4
MOHOS Y LEVADURAS			3
AEROBIOS MESOFILOS		Cabina de flujo laminar	0
MOHOS Y LEVADURAS			0
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de pases	Mesa 1	2
MOHOS Y LEVADURAS			3
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de pases	Mesa 2	3
MOHOS Y LEVADURAS			4
AEROBIOS MESOFILOS			
MOHOS Y LEVADURAS			
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de preparación de medios de cultivo		3
MOHOS Y LEVADURAS			2
AEROBIOS MESOFILOS			
MOHOS Y LEVADURAS			
AEROBIOS MESOFILOS			
MOHOS Y LEVADURAS			
AEROBIOS MESOFILOS			
MOHOS Y LEVADURAS			
AEROBIOS MESOFILOS			
MOHOS Y LEVADURAS			

Observaciones.

Bacterias aerobias mesófilas viables  $\leq 15$  UFC/placa/15min; Mohos y levaduras  $\leq 15$  UFC/placa/15min

  
ANALISTA RESPONSABLE

  
V.B. JEFE DE SECCION/SUPERVISOR

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CALLAO CHIMBOTE PIURA	MONITOREO MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL
---	------------------------------------

Fecha de inicio: 13-10-21

Fecha de término: 13-10-26

Medios usados: PC Lote: 725

OGY Lote: 726

MICROORGANISMO	SECCION	RESULTADO UFC/15 min
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de siembra	Mesa 1
MOHOS Y LEVADURAS		3
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de siembra	Mesa 2
MOHOS Y LEVADURAS		2
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de siembra	Mesa 3
MOHOS Y LEVADURAS		1
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de siembra	Mesa 4
MOHOS Y LEVADURAS		1
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de siembra	Mesa 5
MOHOS Y LEVADURAS		4
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de siembra	Mesa 6
MOHOS Y LEVADURAS		2
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de siembra	Mesa 7
MOHOS Y LEVADURAS		4
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de siembra	Mesa 8
MOHOS Y LEVADURAS		4
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de siembra	Mesa 9
MOHOS Y LEVADURAS		5
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de siembra	Mesa 10
MOHOS Y LEVADURAS		2
AEROBIOS MESOFILOS	Cabinas de flujo laminar	Mesa 1
MOHOS Y LEVADURAS		0
AEROBIOS MESOFILOS	Cabinas de flujo laminar	Mesa 2
MOHOS Y LEVADURAS		0
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de pases	Mesa 1
MOHOS Y LEVADURAS		2
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de pases	Mesa 2
MOHOS Y LEVADURAS		1
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de pases	Mesa 3
MOHOS Y LEVADURAS		3
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de pases	Mesa 4
MOHOS Y LEVADURAS		3
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de pases	Mesa 5
MOHOS Y LEVADURAS		
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de preparación de medios de cultivo	Mesa 6
MOHOS Y LEVADURAS		2
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de preparación de medios de cultivo	Mesa 7
MOHOS Y LEVADURAS		2
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de preparación de medios de cultivo	Mesa 8
MOHOS Y LEVADURAS		
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de preparación de medios de cultivo	Mesa 9
MOHOS Y LEVADURAS		
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de preparación de medios de cultivo	Mesa 10
MOHOS Y LEVADURAS		
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de preparación de medios de cultivo	Mesa 11
MOHOS Y LEVADURAS		
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de preparación de medios de cultivo	Mesa 12
MOHOS Y LEVADURAS		

Observaciones:

Bacterias aerobias mesófilas viables  $\leq 15$  UFC/placa/15min; Mohos y levaduras  $\leq 15$  UFC/placa/15min

  
ANALISTA RESPONSABLE

  
V.B. JEFE DE SECCIÓN/SUPERVISOR

<b>LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA</b>	<b>MONITOREO MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL</b>
CALLAO <input type="checkbox"/> CHIMBOTE <input type="checkbox"/> PIURA <input type="checkbox"/>	

Fecha de inicio: 13-10-22

Fecha de término: 13-11-01

Medios usados: PC Lote: 910

OGY Lote: 912

MICROORGANISMO	SECCION	RESULTADO UFC/15 min	
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de siembra	Mesa 1	5
MOHOS Y LEVADURAS			4
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de siembra	Mesa 2	6
MOHOS Y LEVADURAS			3
AEROBIOS MESOFILOS		Mesa 3	5
MOHOS Y LEVADURAS			3
AEROBIOS MESOFILOS		Mesa 4	3
MOHOS Y LEVADURAS			2
AEROBIOS MESOFILOS		Mesa 5	2
MOHOS Y LEVADURAS			2
AEROBIOS MESOFILOS		Cubierta de flujos laminar	0
MOHOS Y LEVADURAS			0
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de pases	Mesa 1	3
MOHOS Y LEVADURAS			3
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de pases	Mesa 2	4
MOHOS Y LEVADURAS			4
AEROBIOS MESOFILOS			
MOHOS Y LEVADURAS			
AEROBIOS MESOFILOS	Sala de preparación de medios de cultivo		5
MOHOS Y LEVADURAS			3
AEROBIOS MESOFILOS			
MOHOS Y LEVADURAS			
AEROBIOS MESOFILOS			
MOHOS Y LEVADURAS			
AEROBIOS MESOFILOS			
MOHOS Y LEVADURAS			
AEROBIOS MESOFILOS			
MOHOS Y LEVADURAS			

Observaciones:

Bacterias aerobias mesófilas viables  $\leq 15$  UFC/placa/15min; Mohos y levaduras  $\leq 15$  UFC/placa/15min

  
ANALISTA RESPONSABLE

  
V°B° JEFE DE SECCION/SUPERVISOR

Anexo 6. Registros de temperatura de equipos de trabajo.



LABORATORIO MICROBIOLOGÍA <input checked="" type="checkbox"/> LABORATORIO TOXINAS E HIDROBIOLOGÍA <input type="checkbox"/>		<b>REGISTRO DE TEMPERATURA</b>				EQUIPO: <u>Incubadora</u> CODIGO DEL EQUIPO: <u>1210</u> TEMP. PERMISIBLE: <u>30°C ± 1°C</u> UBICACIÓN: <u>Sala de incubación</u>	
						MES: <u>Octubre</u> AÑO: <u>2013</u>	
DIA	HORA MAÑANA	TEMP. OBS. (°C)	T.C.V. (°C)	HORA TARDE	TEMP. OBS. (°C)	T.C.V. (°C)	RESPONSABLE
1	8:30	29.0	30.3	18:10	29.0	30.2	[Signature]
2	8:35	29.0	30.3	18:20	29.0	30.3	[Signature]
3	8:40	29.0	30.3	18:15	29.0	30.3	[Signature]
4	8:42	29.0	30.3	18:35	29.0	30.3	[Signature]
5	8:30	29.0	30.3	18:25	29.0	30.3	[Signature]
6	8:31	29.0	30.3	18:30	29.0	30.3	[Signature]
7	8:32	29.0	30.3	18:15	29.0	30.3	[Signature]
8	8:35	29.0	30.3	18:10	29.0	30.3	[Signature]
9	8:40	29.0	30.3	18:17	29.0	30.3	[Signature]
10	8:41	29.0	30.3	18:30	29.0	30.3	[Signature]
11	8:31	29.0	30.3	18:20	29.0	30.3	[Signature]
12	8:35	29.0	30.3	18:25	29.0	30.3	[Signature]
13	8:33	29.0	30.3	18:20	29.0	30.3	[Signature]
14	8:40	29.0	30.3	18:35	29.0	30.3	[Signature]
15	8:42	29.0	30.3	18:40	29.0	30.3	[Signature]
16	8:50	29.0	30.3	18:41	29.0	30.3	[Signature]
17	8:51	29.0	30.3	18:32	29.0	30.3	[Signature]
18	8:52	29.0	30.3	18:33	29.0	30.3	[Signature]
19	8:53	29.0	30.3	18:15	29.0	30.3	[Signature]
20	8:54	29.0	30.3	18:16	29.0	30.3	[Signature]
21	8:55	29.0	30.3	18:17	29.0	30.3	[Signature]
22	8:30	29.0	30.3	18:42	29.0	30.3	[Signature]
23	8:32	29.0	30.3	18:30	29.0	30.3	[Signature]
24	8:33	29.0	30.3	19:00	29.0	30.3	[Signature]
25	8:35	29.0	30.3	18:50	29.0	30.3	[Signature]
26	8:40	29.0	30.3	18:48	29.0	30.3	[Signature]
27	8:45	29.0	30.3	18:42	29.0	30.3	[Signature]
28	8:38	29.0	30.3	18:37	29.0	30.3	[Signature]
29	8:40	29.0	30.3	18:30	29.0	30.3	[Signature]
30	8:50	29.0	30.3	18:40	29.0	30.3	[Signature]
31	8:51	29.0	30.3	18:50	29.0	30.3	[Signature]

TEMP. OBS. = TEMPERATURA OBSERVADA:  
 T.C.V. = TEMPERATURA CONVENCIONALMENTE VERDADERA  
 ESCALA DEL TERMOMETRO: \_\_\_\_\_  
 CODIGO DE TERMOMETRO: \_\_\_\_\_

VoBo Jefe de Sección / Supervisor

LABORATORIO MICROBIOLOGÍA <input checked="" type="checkbox"/> LABORATORIO TOXINAS E HIDROBIOLOGÍA <input type="checkbox"/>		<b>REGISTRO DE TEMPERATURA</b>				EQUIPO: <u>Sinubadora</u> CODIGO DEL EQUIPO: <u>1210</u> TEMP. PERMISIBLE <u>30°C ± 1°C</u> UBICACIÓN: <u>Sala de incubación</u>	
						MES: <u>Noviembre</u> AÑO: <u>2013</u>	
DIA	HORA MAÑANA	TEMP. OBS. (°C)	T.C.V. (°C)	HORA TARDE	TEMP. OBS (°C)	T.C.V. (°C)	RESPONSABLE
1	8:41	29.0	30.3	18:30	29.0	30.3	[Signature]
2	8:42	29.0	30.3	18:10	29.0	30.3	[Signature]
3	8:41	29.0	30.3	18:00	29.0	30.3	[Signature]
4	8:40	29.0	30.3	18:05	29.0	30.3	[Signature]
5	8:42	29.0	30.3	18:12	29.0	30.3	[Signature]
6	8:43	29.0	30.3	18:13	29.0	30.3	[Signature]
7	8:45	29.0	30.3	18:15	29.0	30.3	[Signature]
8	8:50	29.0	30.3	18:25	29.0	30.3	[Signature]
9	8:55	29.0	30.3	18:30	29.0	30.3	[Signature]
10	8:56	29.0	30.3	18:32	29.0	30.3	[Signature]
11	8:57	29.0	30.3	18:33	29.0	30.3	[Signature]
12	8:48	29.0	30.3	18:40	29.0	30.3	[Signature]
13	8:50	29.0	30.3	18:45	29.0	30.3	[Signature]
14	8:30	29.0	30.3	18:47	29.0	30.3	[Signature]
15	8:35	29.0	30.3	18:30	29.0	30.3	[Signature]
16	8:40	29.0	30.3	18:50	29.0	30.3	[Signature]
17	8:37	29.0	30.3	18:30	29.0	30.3	[Signature]
18	8:40	29.0	30.3	18:40	29.0	30.3	[Signature]
19	8:45	29.0	30.3	18:45	29.0	30.3	[Signature]
20	8:38	29.0	30.3	18:42	29.0	30.3	[Signature]
21	8:42	29.0	30.3	18:40	29.0	30.3	[Signature]
22	8:43	29.0	30.3	18:30	29.0	30.3	[Signature]
23	8:44	29.0	30.3	18:32	29.0	30.3	[Signature]
24	8:50	29.0	30.3	18:30	29.0	30.3	[Signature]
25	8:51	29.0	30.3	18:42	29.0	30.3	[Signature]
26	8:53	29.0	30.3	18:43	29.0	30.3	[Signature]
27	8:54	29.0	30.3	18:44	29.0	30.3	[Signature]
28	8:57	29.0	30.3	18:45	29.0	30.3	[Signature]
29	8:59	29.0	30.3	18:10	29.0	30.3	[Signature]
30	8:30	29.0	30.3	18:05	29.0	30.3	[Signature]
31		29.0					

TEMP. OBS. = TEMPERATURA OBSERVADA;

T.C.V. = TEMPERATURA CONVENCIONALMENTE VERDADERA

ESCALA DEL TERMOMETRO: \_\_\_\_\_

CODIGO DE TERMOMETRO: \_\_\_\_\_

  
 VoBo Jefe de Sección / Supervisor

LABORATORIO MICROBIOLOGÍA <input checked="" type="checkbox"/>  LABORATORIO TOXINAS E HIDROBIOLOGÍA <input type="checkbox"/>		<b>REGISTRO DE TEMPERATURA</b>				EQUIPO: <u>Incubadora</u> CODIGO DEL EQUIPO: <u>1201</u> TEMP. PERMISIBLE <u>37°C ± 1°C</u> UBICACIÓN: <u>Sala de Incubadora</u>	
				MES: <u>Octubre</u> AÑO: <u>2013</u>			
DIA	HORA MAÑANA	TEMP. OBS. (°C)	T.C.V. (°C)	HORA TARDE	TEMP. OBS (°C)	T.C.V. (°C)	RESPONSABLE
1	8:21	37.3	36.6	18:11	37.3	36.6	AB
2	8:32	37.3	36.6	18:22	37.3	36.6	AB
3	8:42	37.3	36.6	18:18	37.3	36.6	AB
4	8:22	37.3	36.6	18:27	37.3	36.6	AB
5	8:33	37.3	36.6	18:28	37.3	36.6	AB
6	8:35	37.3	36.6	18:25	37.3	36.6	AB
7	8:32	37.3	36.6	18:20	37.3	36.6	AB
8	8:40	37.3	36.6	18:15	37.3	36.6	AB
9	8:45	37.3	36.6	18:13	37.3	36.6	AB
10	8:43	37.3	36.6	18:15	37.3	36.6	AB
11	8:35	37.3	36.6	18:35	37.7	36.6	AB
12	8:39	37.3	36.6	18:23	37.3	36.6	AB
13	8:38	37.3	36.6	18:28	37.3	36.6	AB
14	8:42	37.3	36.6	18:37	37.3	36.6	AB
15	8:45	37.3	36.6	18:47	37.3	36.6	AB
16	8:55	37.3	36.6	18:44	37.3	36.6	AB
17	8:53	37.3	36.6	18:35	37.3	36.6	AB
18	8:55	37.3	36.6	18:17	37.3	36.6	AB
19	8:55	37.3	36.6	18:17	37.3	36.6	AB
20	8:59	37.3	36.6	18:20	37.3	36.6	AB
21	8:59	37.3	36.6	18:44	37.3	36.6	AB
22	8:35	37.3	36.6	18:33	37.3	36.6	AB
23	8:35	37.3	36.6	18:02	37.3	36.6	AB
24	8:35	37.3	36.6	18:55	37.3	36.6	AB
25	8:40	37.3	36.6	18:50	37.3	36.6	AB
26	8:48	37.3	36.6	18:49	37.3	36.6	AB
27	8:48	37.3	36.6	18:39	37.3	36.6	AB
28	8:38	37.3	36.6	18:35	37.3	36.6	AB
29	8:50	37.3	36.6	18:37	37.3	36.6	AB
30	8:53	37.3	36.6	18:42	37.3	36.6	AB
31	8:54	37.3	36.6	18:53	37.3	36.6	AB

TEMP. OBS. = TEMPERATURA OBSERVADA:

T.C.V. = TEMPERATURA CONVENCIONALMENTE VERDADERA

ESCALA DEL TERMOMETRO: \_\_\_\_\_

CODIGO DE TERMOMETRO: \_\_\_\_\_

  
 VoBo Jefe de Sección / Supervisor

LABORATORIO MICROBIOLOGÍA <input checked="" type="checkbox"/>  LABORATORIO TOXINAS E HIDROBIOLOGÍA <input type="checkbox"/>		<b>REGISTRO DE TEMPERATURA</b>				EQUIPO: <u>Incubadora</u> CODIGO DEL EQUIPO: <u>1201</u> TEMP. PÉRMISIBLE <u>37°C ± 1°C</u> UBICACIÓN: <u>Sala de incubación</u>	
						MES: <u>Noviembre</u> AÑO: <u>2013</u>	
DIA	HORA MAÑANA	TEMP. OBS. (°C)	T.C.V. (°C)	HORA TARDE	TEMP. OBS. (°C)	T.C.V. (°C)	RESPONSABLE
1	8:43	37.3	36.6	18:33	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
2	8:45	37.3	36.6	18:12	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
3	8:44	37.3	36.6	18:05	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
4	8:42	37.3	36.6	18:07	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
5	8:44	37.3	36.6	18:15	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
6	8:45	37.3	36.6	18:15	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
7	8:47	37.3	36.6	18:12	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
8	8:55	37.3	36.6	18:26	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
9	8:57	37.3	36.6	18:33	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
10	8:59	37.3	36.6	18:35	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
11	8:59	37.3	36.6	18:35	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
12	8:49	37.3	36.6	18:42	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
13	8:52	37.3	36.6	18:47	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
14	8:33	37.3	36.6	18:35	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
15	8:38	37.3	36.6	18:52	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
16	8:42	37.3	36.6	18:35	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
17	8:40	37.3	36.6	18:43	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
18	8:43	37.3	36.6	18:47	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
19	8:47	37.3	36.6	18:45	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
20	8:40	37.3	36.6	18:44	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
21	8:43	37.3	36.6	18:35	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
22	8:45	37.3	36.6	18:35	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
23	8:46	37.3	36.6	18:33	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
24	8:55	37.3	36.6	18:33	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
25	8:54	37.3	36.6	18:45	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
26	8:55	37.3	36.6	18:45	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
27	8:54	37.3	36.6	18:47	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
28	8:59	37.3	36.6	18:47	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
29	8:59	37.3	36.6	18:15	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
30	8:33	37.3	36.6	18:10	37.3	36.6	<i>[Signature]</i>
31							

TEMP. OBS. = TEMPERATURA OBSERVADA:

T.C.V. = TEMPERATURA CONVENCIONALMENTE VERDADERA

ESCALA DEL TERMOMETRO: \_\_\_\_\_

CODIGO DE TERMOMETRO: \_\_\_\_\_

*[Signature]*  
VoBo Jefe de Sección / Supervisor

LABORATORIO MICROBIOLOGÍA <input checked="" type="checkbox"/>		<b>REGISTRO DE TEMPERATURA</b>				EQUIPO: <u>incubadora</u>	
LABORATORIO TOXINAS E HIDROBIOLOGÍA <input type="checkbox"/>						CODIGO DEL EQUIPO: <u>2516</u>	
				TEMP. PERMISIBLE <u>25°C ± 1°C</u>		UBICACIÓN: <u>Sala de incubación</u>	
				MES: <u>Octubre</u>		AÑO: <u>2013</u>	
DIA	HORA MAÑANA	TEMP. OBS. (°C)	T.C.V. (°C)	HORA TARDE	TEMP. OBS. (°C)	T.C.V. (°C)	RESPONSABLE
1	8:32	23.6	25.4	18:13	23.7	25.4	<i>[Signature]</i>
2	8:32	23.6	25.4	18:22	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
3	8:43	23.6	25.4	18:17	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
4	8:45	23.6	25.4	18:37	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
5	8:33	23.6	25.4	18:29	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
6	8:34	23.7	25.4	18:33	23.7	25.4	<i>[Signature]</i>
7	8:35	23.6	25.4	18:17	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
8	8:42	23.6	25.4	18:15	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
9	8:43	23.6	25.4	18:15	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
10	8:43	23.6	25.4	18:33	23.7	25.4	<i>[Signature]</i>
11	8:35	23.7	25.4	18:24	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
12	8:38	23.6	25.4	18:26	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
13	8:39	23.6	25.4	18:25	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
14	8:42	23.6	25.4	18:23	23.7	25.4	<i>[Signature]</i>
15	8:45	23.6	25.4	18:33	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
16	8:52	23.6	25.4	18:43	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
17	8:53	23.7	25.4	18:35	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
18	8:55	23.6	25.4	18:35	23.7	25.4	<i>[Signature]</i>
19	8:55	23.6	25.4	18:17	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
20	8:57	23.7	25.4	18:18	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
21	8:57	23.6	25.4	18:19	23.7	25.4	<i>[Signature]</i>
22	8:35	23.6	25.4	18:45	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
23	8:35	23.6	25.4	18:35	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
24	8:33	23.6	25.4	19:03	23.7	25.4	<i>[Signature]</i>
25	8:38	23.6	25.4	18:52	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
26	8:42	23.6	25.4	18:50	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
27	8:47	23.7	25.4	18:49	23.7	25.4	<i>[Signature]</i>
28	8:40	23.6	25.4	18:39	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
29	8:58	23.6	25.4	18:32	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
30	8:54	23.7	25.4	18:42	23.7	25.4	<i>[Signature]</i>
31	8:52	23.6	25.4	18:52	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>

TEMP. OBS. = TEMPERATURA OBSERVADA:  
 T.C.V. = TEMPERATURA CONVENCIONALMENTE VERDADERA  
 ESCALA DEL TERMOMETRO: \_\_\_\_\_  
 CODIGO DE TERMOMETRO: \_\_\_\_\_

*[Signature]*  
 VoBo Jefe de Sección / Supervisor

LABORATORIO MICROBIOLOGÍA <input checked="" type="checkbox"/>		<b>REGISTRO DE TEMPERATURA</b>				EQUIPO: <u>Incubadora</u>	
LABORATORIO TOXINAS E HIDROBIOLOGÍA <input type="checkbox"/>						CODIGO DEL EQUIPO: <u>2516</u>	
						UBICACIÓN: <u>Sala de Incubadoras</u>	
						MES: <u>Noviembre</u>	
						AÑO: <u>2013</u>	
DIA	HORA MAÑANA	TEMP. OBS. (°C)	T.C.V. (°C)	HORA TARDE	TEMP. OBS (°C)	T.C.V. (°C)	RESPONSABLE
1	8:42	23.6	25.4	18:32	23.7	25.4	<i>[Signature]</i>
2	8:42	23.6	25.4	18:13	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
3	8:45	23.6	25.4	18:05	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
4	8:47	23.6	25.4	18:07	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
5	8:46	23.6	25.4	18:13	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
6	8:45	23.7	25.4	18:15	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
7	8:46	23.6	25.4	18:17	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
8	8:53	23.6	25.4	18:27	23.7	25.4	<i>[Signature]</i>
9	8:57	23.6	25.4	18:32	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
10	8:58	23.7	25.4	18:35	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
11	8:59	23.6	25.4	18:35	23.7	25.4	<i>[Signature]</i>
12	8:52	23.6	25.4	18:42	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
13	8:52	23.6	25.4	18:48	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
14	8:32	23.6	25.4	18:50	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
15	8:32	23.7	25.4	18:32	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
16	8:45	23.6	25.4	18:52	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
17	8:39	23.6	25.4	18:32	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
18	8:40	23.6	25.4	18:42	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
19	8:47	23.7	25.4	18:47	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
20	8:39	23.6	25.4	18:43	23.7	25.4	<i>[Signature]</i>
21	8:45	23.6	25.4	18:42	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
22	8:45	23.6	25.4	18:35	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
23	8:47	23.7	25.4	18:35	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
24	8:53	23.6	25.4	18:32	23.7	25.4	<i>[Signature]</i>
25	8:53	23.6	25.4	18:47	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
26	8:55	23.7	25.4	18:44	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
27	8:56	23.6	25.4	18:47	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
28	8:59	23.6	25.4	18:46	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
29	8:59	23.6	25.4	18:42	23.6	25.4	<i>[Signature]</i>
30	8:32	23.6	25.4	18:17	23.7	25.4	<i>[Signature]</i>
31							

TEMP. OBS. = TEMPERATURA OBSERVADA:

T.C.V. = TEMPERATURA CONVENCIONALMENTE VERDADERA

ESCALA DEL TERMOMETRO: \_\_\_\_\_

CODIGO DE TERMOMETRO: \_\_\_\_\_

*[Signature]*  
VoBo Jefe de Sección / Supervisor

Anexo 7. Certificados de calibración de los equipos de trabajo.



LABORATORIO DE CALIBRACIÓN ACREDITADO POR  
EL ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACIÓN  
INDECOPI - SNA CON REGISTRO N° LC-001



**CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN N° T-1978-2012**  
CON VALOR OFICIAL SEGÚN CÉDULA DE NOTIFICACIÓN N° 191.2011/SNA-INDECOPI

Fecha de Emisión : 2012-08-02

EXP.: 24791  
Pág. 1 de 5

1. Solicitante : CERTIFICACIONES DEL PERÚ S.A.
2. Dirección. : Av. Santa Rosa N° 601 - La Perla - Callao
3. Equipo calibrado : INCUBADORA
  - Marca / Fabricante : HERAEUS
  - Identificación : 1210
  - Modelo : No indica
  - Serie : No indica
  - Procedencia : Alemania
  - Ventilación : Natural
  - Ubicación : Laboratorio de Microbiología
4. Temperatura de trabajo : 30 °C ± 1 °C
5. Lugar de calibración : Instalaciones de Certificaciones del Perú S.A.
6. Fecha de calibración : 2012-07-12
7. Método de calibración  
La calibración se realizó por comparación directa según el PC-018: 2° Ed. "Procedimiento para la calibración o caracterización de medios isotermos con aire como medio termostático" del SNM INDECOPI.
8. Trazabilidad  
Los resultados de la calibración tienen trazabilidad a los Patrones Nacionales del SNM - INDECOPI. Se utilizó el siguiente instrumento patrón:  
Termómetro con código IT-201 con 10 termopares de códigos K201-01 al K201-10 con Certificado de Calibración N° T-0319-2012 de METROIL S.A.C.
9. Condiciones de calibración
  - Temperatura ambiental : Inic.: 21,5 °C ; Fin.: 21,6 °C
  - Humedad ambiental : Inic.: 59,0 % H.R. ; Fin.: 64,1 % H.R.
  - Volumen Interior : 40 % de carga (\*)

10. Instrumentos de medición del equipo

Nombre	Alcance de Indicación	División Mínima	Tipo
Termómetro Controlador	-50 °C a 70 °C	1 °C	Digital
Termómetro Auxiliar	No indica	0,1 °C	Digital

Los resultados del certificado son válidos sólo para el objeto calibrado y se refieren al momento y condiciones en que se realizaron las mediciones y no deben utilizarse como certificado de conformidad con normas de producto.

Se recomienda al usuario recalibrar el equipo a intervalos adecuados, los cuales deben ser elegidos con base en las características del trabajo realizado, el mantenimiento, conservación y el tiempo de uso del equipo y del instrumento de medición.

METROIL S.A.C no se responsabiliza de los perjuicios que pueda ocasionar el uso inadecuado de este equipo, ni de una incorrecta interpretación de los resultados de la calibración aquí declarados.

Este certificado de calibración es trazable a patrones nacionales o internacionales, los cuales realizan las unidades de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI).

Este certificado de calibración no podrá ser reproducido parcialmente, excepto con autorización previa por escrito de METROIL S.A.C

El certificado de calibración no es válido sin la firma del responsable técnico de METROIL S.A.C

JUAN C. BARTOLO CHUQUIBALA  
Laboratorio de Temperatura y Humedad

Ing. MARCO A. MONTALVO CABREJOS  
Gerente del Servicio Metrología



LABORATORIO DE CALIBRACIÓN ACREDITADO POR  
EL ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACIÓN  
INDECOPI - SNA CON REGISTRO N° LC-001



Registro N° LC-001

Certificado de Calibración N° T-1978-2012  
Pág. 2 de 5

11. Resultado:

CALIBRACIÓN PARA 30 °C

TIEMPO (min.)	T ind. (°C) (Termómetro del equipo)	Termómetro Auxiliar (°C)	TEMPERATURA EN LAS POSICIONES DE MEDICIÓN (°C)										T prom. (°C)	T max - T min (°C)
			NIVEL SUPERIOR					NIVEL INFERIOR						
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
00	29	30.3	30.2	30.3	30.1	30.1	30.3	30.4	30.3	30.4	30.6	30.6	30.3	0.5
02	29	30.3	30.0	30.3	30.2	30.2	30.0	30.3	30.5	30.3	30.4	30.5	30.3	0.6
04	29	30.3	30.1	30.4	30.1	30.0	30.1	30.4	30.5	30.5	30.3	30.5	30.3	0.5
06	29	30.3	30.1	30.3	30.1	30.2	30.2	30.4	30.3	30.4	30.3	30.6	30.3	0.5
08	29	30.3	30.1	30.2	30.1	30.2	30.1	30.2	30.5	30.4	30.4	30.5	30.3	0.4
10	29	30.3	30.1	30.3	30.3	30.2	30.1	30.4	30.5	30.5	30.3	30.5	30.3	0.4
12	29	30.3	30.0	30.2	30.2	29.9	30.1	30.1	30.6	30.3	30.3	30.6	30.2	0.7
14	29	30.3	30.0	30.4	30.0	30.0	30.2	30.3	30.3	30.4	30.3	30.6	30.3	0.6
16	29	30.3	30.0	30.3	30.1	29.9	30.1	30.4	30.6	30.5	30.4	30.2	30.3	0.7
18	29	30.3	29.9	30.3	30.0	29.9	30.1	30.3	30.5	30.4	30.3	30.6	30.2	0.6
20	29	30.3	30.0	30.2	30.2	30.0	30.1	30.2	30.6	30.5	30.3	30.5	30.3	0.6
22	29	30.3	29.9	30.2	30.2	30.0	29.9	30.4	30.6	30.4	30.4	30.4	30.2	0.7
24	29	30.3	30.2	30.3	30.2	30.3	30.3	30.3	30.5	30.5	30.3	30.6	30.4	0.4
26	29	30.3	30.0	30.2	30.1	30.2	30.1	30.2	30.6	30.4	30.4	30.5	30.3	0.6
28	29	30.3	30.3	30.4	30.1	30.2	30.3	30.2	30.3	30.5	30.4	30.4	30.3	0.4
30	29	30.3	29.9	30.3	29.9	30.0	30.2	30.3	30.6	30.4	30.4	30.5	30.3	0.7
32	29	30.3	30.2	30.4	30.1	30.0	30.1	30.3	30.3	30.5	30.3	30.4	30.3	0.5
34	29	30.3	30.0	30.3	30.2	30.0	30.0	30.1	30.5	30.3	30.4	30.5	30.2	0.5
36	29	30.3	30.1	30.2	30.1	30.0	30.2	30.3	30.6	30.4	30.4	30.5	30.3	0.6
38	29	30.3	30.2	30.4	30.1	30.2	30.1	30.4	30.3	30.5	30.3	30.4	30.3	0.4
40	29	30.3	30.1	30.4	30.0	30.0	30.2	30.3	30.4	30.5	30.5	30.5	30.3	0.5
42	29	30.3	29.9	30.3	30.2	30.0	29.9	30.4	30.3	30.4	30.6	30.6	30.3	0.7
44	29	30.3	30.2	30.4	30.0	30.3	30.3	30.3	30.5	30.3	30.6	30.6	30.4	0.6
46	29	30.3	30.0	30.2	30.2	29.9	30.1	30.2	30.6	30.4	30.3	30.6	30.3	0.7
48	29	30.3	30.0	30.4	30.0	30.0	30.2	30.3	30.3	30.3	30.3	30.6	30.2	0.6
50	29	30.3	30.0	30.3	30.1	29.9	30.1	30.4	30.6	30.4	30.4	30.3	30.3	0.7
52	29	30.3	29.9	30.3	30.0	29.9	30.1	30.3	30.5	30.4	30.3	30.6	30.2	0.7
54	29	30.3	30.0	30.2	30.2	30.0	30.1	30.2	30.6	30.3	30.3	30.5	30.2	0.6
56	29	30.3	29.9	30.2	30.2	30.0	29.9	30.4	30.6	30.4	30.4	30.5	30.3	0.7
58	29	30.3	30.2	30.3	30.2	30.3	30.3	30.3	30.5	30.4	30.3	30.6	30.3	0.4
60	29	30.3	30.0	30.2	30.1	30.2	30.1	30.2	30.6	30.5	30.4	30.5	30.3	0.6
T.PROM	29	30.3	30.0	30.3	30.1	30.1	30.1	30.3	30.5	30.4	30.4	30.5	30.3	
T.MAX	29	30.3	30.3	30.4	30.3	30.3	30.3	30.4	30.6	30.5	30.6	30.6	30.6	
T.MIN	29	30.3	29.9	30.2	29.9	29.9	29.9	30.1	30.3	30.3	30.3	30.3	30.3	
DTT	0	0.0	0.4	0.2	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	

Parámetro	Valor (°C)	Incertidumbre Expandida (°C)
Máxima Temperatura Medida	30.6	0.3
Mínima Temperatura Medida	29.9	0.3
Desviación de Temperatura en el Tiempo	0.4	0.1
Desviación de Temperatura en el Espacio	0.5	0.4
Estabilidad Medida (±)	0.20	0.04
Uniformidad Medida	0.7	0.4



T. PROM: Promedio de la temperatura en una posición de medición durante el tiempo de calibración.  
T prom: Promedio de las temperaturas en las diez posiciones de medición para un instante dado.  
T. MAX: Temperatura máxima  
T. MIN: Temperatura mínima  
DTT: Desviación de Temperatura en el Tiempo.

Para cada posición de medición su "desviación de temperatura en el tiempo" DTT está dada por la diferencia entre la máxima y la mínima temperatura registradas en dicha posición.  
Entre dos posiciones de medición su "desviación de temperatura en el espacio" está dada por la diferencia entre los promedios de temperaturas registradas en ambas posiciones.



METROLOGÍA E INGENIERÍA LINO S.A.C.

Oficina (Ventas - Recepción): Av. Canadá 1557 - La Victoria - Lima 13 • Central Telefónica: (511) 713-9080 / 713-8081 Nextel: 109\*8844 / 109\*8846 RPM \*481570  
Laboratorios: Av. Universitaria Norte 8903 - Comas - Lima 7 • Central Telefónica: (511) 713-9070 / 713-9074 Telefax Central: (511) 718-4825  
E-mail: ventas@metroil.com.pe / Web: www.metroil.com.pe

F-M-084 / Mar 2011 / Rev. 05:



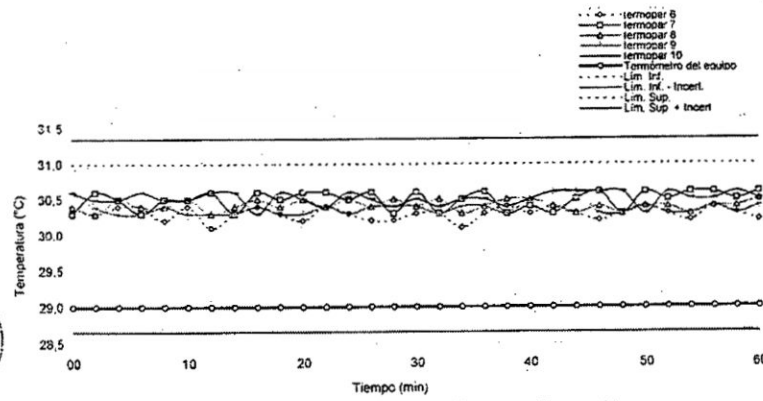
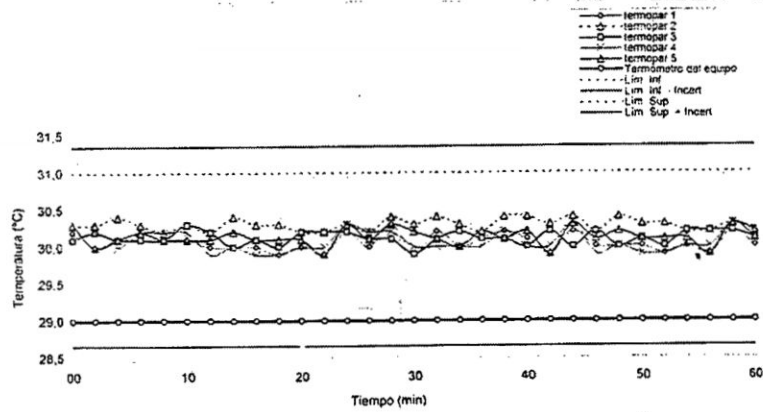
LABORATORIO DE CALIBRACIÓN ACREDITADO POR  
EL ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACIÓN  
INDECOPI - SNA CON REGISTRO N° LC-001



Registro N° LC-001

Certificado de Calibración N° T-1978-2012  
Pág. 3 de 5

TEMPERATURA DE TRABAJO 30 °C

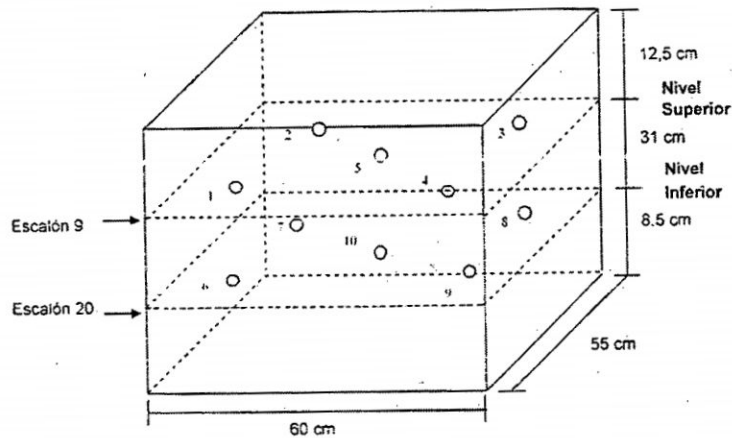


METROLOGIA E INGENIERIA LINO S.A.C.

Oficina (Ventas - Recepción): Av. Canadá 1557 - La Victoria - Lima 13 • Central Telefónica: (511) 713-9080 / 713-9081 Nextel: 109\*8844 / 109\*8846 RPM \*481570  
Laboratorios: Av. Universitaria Norte 8903 - Comas - Lima 7 • Central Telefónica: (511) 713-9070 / 713-9074 Telefax Central: (511) 718-4825  
E-mail: ventas@metroil.com.pe / Web: www.metroil.com.pe

F-M-084 / Mar 2011 / Rev. 05

12. Distribución de termopares en el equipo



- Los termopares 5 y 10 se ubicaron sobre el centro de sus respectivos niveles.
- Los demás termopares se ubicaron a 13 cm de las paredes laterales y a 12 cm del fondo y frente del equipo.
- Los termopares del nivel superior se ubicaron a 1,5 cm por encima de la altura más alta que emplea el usuario.
- Los termopares del nivel inferior se ubicaron a 1,5 cm por debajo de la parrilla más baja que emplea el usuario.

13. Observaciones

- Se adjunta una etiqueta autoadhesiva con la indicación "CALIBRADO".
- Antes de la calibración no se realizó ningún tipo de ajuste.
- La calibración se efectuó 2 horas después que se cerró la puerta y se encendió el equipo.
- Durante la calibración y bajo las condiciones en que esta ha sido hecha, el medio isoterma CUMPLE con los límites especificados de temperatura.
- El controlador del equipo se programó en 29 °C para la temperatura de trabajo indicada en el ítem 4.
- La incertidumbre expandida de la medición se ha obtenido multiplicando la incertidumbre estándar de la medición por el factor de cobertura  $k = 2$  que, para una distribución normal corresponde a una probabilidad de cobertura de aproximadamente 95 %.
- (\*) La carga estaba constituida por 25 placas petri y 4 matraces de 250 ml.
- El código del termómetro auxiliar es "T-6".

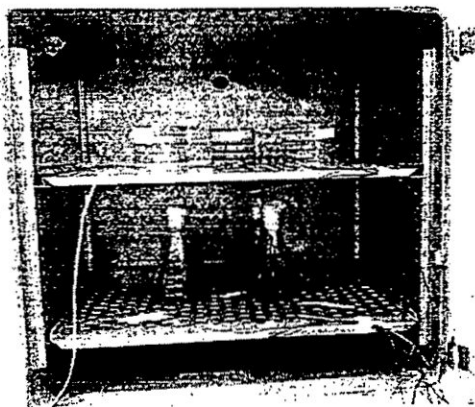


METROLOGIA E INGENIERÍA LINO S.A.C.

Oficina (Ventas - Recepción): Av. Canadá 1557 - La Victoria - Lima 13 • Central Telefónica: (511) 713-9080 / 713-9081 Nextel: 109\*8844 / 109\*8845 RPM \*481570  
Laboratorios: Av. Universitaria Norte 8903 - Comas - Lima 7 • Central Telefónica: (511) 713-9070 / 713-9074 Telefax Central: (511) 718-4825  
E-mail: ventas@metroil.com.pe / Web: www.metroil.com.pe

F-M-084 / Mar 2011 / Rev. 05

Fotografía mostrando la ubicación de los sensores de temperatura y de las cargas en el medio isoterma



(FIN DEL DOCUMENTO)



METROLOGIA E INGENIERIA LINO S.A.C.

Oficina (Ventas - Recepción): Av. Canadá 1557 - La Victoria - Lima 13 • Central Telefónica: (511) 713-9080 / 713-9081 Nextel: 109\*8844 / 109\*8846 RPM \*481570  
Laboratorios: Av. Universitaria Norte 8903 - Comas - Lima 7 • Central Telefónica: (511) 713-9070 / 713-9074 Telfax Central: (511) 718-4825  
E-mail: ventas@metroil.com.pe / Web: www.metroil.com.pe

F-M-084 / Mar 2011 / Rev. 05





LABORATORIO DE CALIBRACIÓN ACREDITADO POR  
EL ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACIÓN  
INDECOPI - SNA CON REGISTRO N° LC-001



Registro N° LC-001

**CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN N° TC-0431-2014**  
CON VALOR OFICIAL SEGÚN CÉDULA DE NOTIFICACIÓN N° 191.2011/SNA-INDECOPI

Fecha de Emisión : 2014-05-13

EXP.: 38917  
Pág. 1 de 5

1. Solicitante : CERTIFICACIONES DEL PERÚ S.A.
2. Dirección : Av. Santa Rosa N° 601 La Perla - Callao
3. Equipo calibrado : INCUBADORA
  - Marca / Fabricante : HERAEUS
  - Identificación : 1201
  - Modelo : B 5060
  - Serie : 7901103
  - Procedencia : No indica
  - Ventilación : Natural
  - Ubicación : Laboratorio de Microbiología
4. Temperatura de trabajo : 37 °C ± 1 °C
5. Lugar de calibración : Instalaciones de Certificaciones del Perú S.A
6. Fecha de calibración : 2014-05-06

7. Método de calibración  
La calibración se realizó por comparación directa según el PC-018: 2ª Ed., "Procedimiento para la calibración o caracterización de medios isotermos con aire como medio termostático" del SNM INDECOPI.

8. Trazabilidad  
Los resultados de la calibración tienen trazabilidad a los Patrones Nacionales del SNM - INDECOPI. Se utilizó el siguiente instrumento patrón:  
Termómetro con código IT-154 con 10 termopares de códigos K154-31 al K154-40 con Certificado de Calibración N° T-0077-2014 de METROIL S.A.C.

9. Condiciones de calibración  
Temperatura ambiental : Inic.: 21,2 °C ; Fin.: 21,4 °C  
Humedad ambiental : Inic.: 60,1 % H.R. ; Fin.: 52,9 % H.R.  
Volumen Interior : 40 % de carga (\*)

10. Instrumentos de medición del equipo

Nombre	Alcance de Indicación	División Mínima	Tipo
Termómetro Controlador	-199,9 °C a 500,0 °C	0,1 °C	Digital

Los resultados del certificado son válidos sólo para el objeto calibrado y se refieren al momento y condiciones en que se realizaron las mediciones y no deben utilizarse como certificado de conformidad con normas de producto.

Se recomienda al usuario recalibrar el equipo a intervalos adecuados, los cuales deben ser elegidos con base en las características del trabajo realizado, el mantenimiento, conservación y el tiempo de uso del equipo y del instrumento de medición.

METROIL S.A.C. no se responsabiliza de los perjuicios que pueda ocasionar el uso inadecuado de este equipo, ni de una incorrecta interpretación de los resultados de la calibración aquí declarados.

Este certificado de calibración es trazable a patrones nacionales o internacionales, los cuales realizan las unidades de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI).

Este certificado de calibración no podrá ser reproducido parcialmente, excepto con autorización previa por escrito de METROIL S.A.C.

El certificado de calibración no es válido sin la firma del responsable técnico de METROIL S.A.C.

LABORATORIO SVA  
JUAN C. BARTOLO CHUQUIBALA  
Jefe del Laboratorio 4

INGENIERIA LINO S.A.C.  
Ing. MARCO A. MONTALVO CABREJOS  
Gerente del Servicio Metroológico

**METROLOGIA E INGENIERIA LINO S.A.C.**

Oficina (Ventas - Recepción - Entrega): Av. Venezuela 2040 - Lima - Lima Central Telf.: (511) 713-9066 / 713-9080 Nextel: 109\*8846 RPM: # 999048181  
Consulta Técnica: Central Telf.: 713-9070 / 713-9071 RPM: \*481579 Nextel: 832\*3234 - E-mail: ventas@metroil.com.pe / web: www.metroil.com.pe

F-M-084 / Mar 2011 / Rev. 05



11. Resultado:

CALIBRACIÓN PARA 37 °C

TIEMPO (min.)	T ind. (°C) (Termómetro del equipo)	TEMPERATURA EN LAS POSICIONES DE MEDICIÓN (°C)										T prom. (°C)	T max - T min (°C)
		NIVEL SUPERIOR					NIVEL INFERIOR						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
00	37,3	36,3	36,3	36,2	36,5	36,7	36,2	36,9	37,3	36,8	36,2	36,5	1,1
02	37,3	36,3	36,3	36,3	36,4	36,6	36,2	36,9	37,4	36,7	36,2	36,5	1,2
04	37,3	36,2	36,4	36,4	36,4	36,7	36,2	36,9	37,3	36,7	36,2	36,5	1,1
06	37,3	36,3	36,3	36,4	36,4	36,6	36,2	36,9	37,3	36,7	36,2	36,5	1,1
08	37,3	36,3	36,3	36,3	36,6	36,8	36,5	37,1	37,5	36,5	36,5	36,6	1,2
10	37,3	36,3	36,4	36,4	36,7	36,8	36,6	37,2	37,6	36,4	36,5	36,7	1,3
12	37,3	36,3	36,3	36,3	36,6	36,9	36,6	37,1	37,6	36,4	36,6	36,7	1,3
14	37,3	36,3	36,3	36,3	36,5	36,9	36,7	37,2	37,7	36,3	36,6	36,7	1,4
16	37,3	36,2	36,4	36,4	36,7	36,8	36,6	37,2	37,7	36,4	36,5	36,7	1,6
18	37,3	36,3	36,4	36,4	36,6	36,9	36,6	37,2	37,7	36,3	36,5	36,7	1,4
20	37,3	36,3	36,4	36,4	36,5	36,8	36,6	37,2	37,7	36,4	36,5	36,7	1,4
22	37,3	36,3	36,3	36,4	36,6	36,8	36,5	37,2	37,6	36,3	36,4	36,6	1,3
24	37,3	36,4	36,4	36,5	36,6	36,7	36,5	37,1	37,6	36,4	36,4	36,7	1,2
26	37,3	36,3	36,4	36,4	36,5	36,8	36,5	37,1	37,7	36,3	36,5	36,7	1,4
28	37,3	36,3	36,3	36,4	36,5	36,7	36,4	37,2	37,6	36,4	36,4	36,6	1,3
30	37,3	36,3	36,3	36,5	36,6	36,8	36,5	37,2	37,6	36,4	36,4	36,7	1,3
32	37,3	36,3	36,4	36,4	36,5	36,8	36,5	37,1	37,5	36,4	36,4	36,6	1,2
34	37,3	36,3	36,4	36,4	36,5	36,8	36,4	37,1	37,6	36,3	36,4	36,6	1,3
36	37,3	36,2	36,4	36,4	36,5	36,7	36,5	37,1	37,6	36,3	36,5	36,6	1,4
38	37,3	36,3	36,4	36,5	36,5	36,8	36,5	37,1	37,6	36,4	36,4	36,7	1,3
40	37,3	36,4	36,4	36,5	36,6	36,7	36,5	37,1	37,7	36,3	36,5	36,7	1,4
42	37,3	36,3	36,3	36,4	36,6	36,6	36,4	37,2	37,6	36,4	36,4	36,6	1,3
44	37,3	36,4	36,4	36,5	36,5	36,6	36,4	37,2	37,6	36,4	36,5	36,7	1,2
46	37,3	36,4	36,4	36,6	36,8	36,7	36,5	37,1	37,7	36,4	36,4	36,7	1,3
48	37,3	36,3	36,4	36,5	36,5	36,7	36,5	37,1	37,7	36,4	36,3	36,6	1,4
50	37,3	36,4	36,4	36,4	36,5	36,7	36,5	37,1	37,7	36,4	36,4	36,7	1,3
52	37,3	36,3	36,4	36,5	36,5	36,6	36,4	37,2	37,6	36,3	36,3	36,6	1,3
54	37,3	36,3	36,4	36,5	36,6	36,6	36,4	37,2	37,6	36,3	36,3	36,6	1,3
56	37,3	36,4	36,4	36,5	36,5	36,8	36,6	37,2	37,5	36,3	36,2	36,6	1,3
58	37,3	36,4	36,3	36,5	36,5	36,7	36,4	37,1	37,6	36,4	36,4	36,6	1,3
60	37,3	36,3	36,3	36,6	36,6	36,7	36,5	37,1	37,6	36,4	36,3	36,6	1,3
T.PROM	37,3	36,3	36,4	36,4	36,5	36,7	36,5	37,1	37,6	36,4	36,4	36,6	
T.MAX	37,3	36,4	36,4	36,6	36,7	36,9	36,7	37,2	37,7	36,7	36,7	36,6	
T.MIN	37,3	36,2	36,3	36,2	36,4	36,6	36,2	36,9	37,3	36,3	36,2	36,2	
DTT	0,0	0,2	0,1	0,4	0,3	0,3	0,5	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	

Parámetro	Valor (°C)	Incertidumbre Expandida (°C)
Máxima Temperatura Medida	37,7	0,32
Mínima Temperatura Medida	36,2	0,32
Desviación de Temperatura en el Tiempo	0,5	0,1
Desviación de Temperatura en el Espacio	1,3	0,4
Estabilidad Medida (±)	0,25	0,04
Uniformidad Medida	1,6	0,4

T.PROM: Promedio de la temperatura en una posición de medición durante el tiempo de calibración.  
T.prom: Promedio de las temperaturas en las diez posiciones de medición para un instante dado.  
T.MAX: Temperatura máxima  
T.MIN: Temperatura mínima  
DTT: Desviación de Temperatura en el Tiempo.

Para cada posición de medición su "desviación de temperatura en el tiempo" DTT está dada por la diferencia entre la máxima y la mínima temperatura registradas en dicha posición.  
Entre dos posiciones de medición su "desviación de temperatura en el espacio" está dada por la diferencia entre los promedios de temperaturas registradas en ambas posiciones.



METROLOGIA E INGENIERIA LINO S.A.C.

Oficina (Ventas - Recpción - Entrega): Av. Venezuela 2040 - Lima - Lima Central Telf.: (511) 713-9066 / 713-9080 Nextel: 109\*8846 RPM: # 999048181  
Consulta Técnica: Central Telf.: 713-9070 / 713-9071 RPM: \*481579 Nextel: 832\*3234 - E-mail: ventas@metroil.com.pe / web: www.metroil.com.pe

F-M-084 / Mar 2011 / Rev. 05



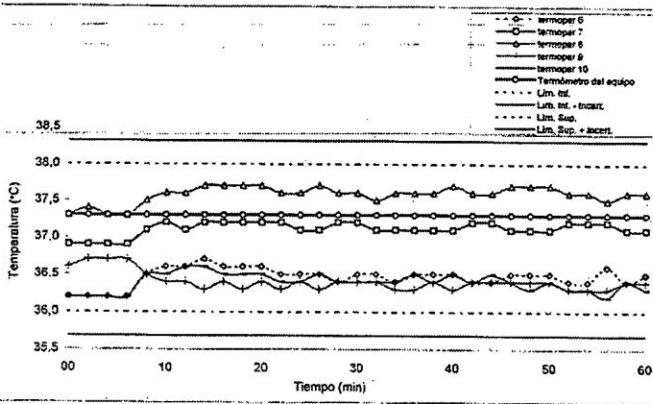
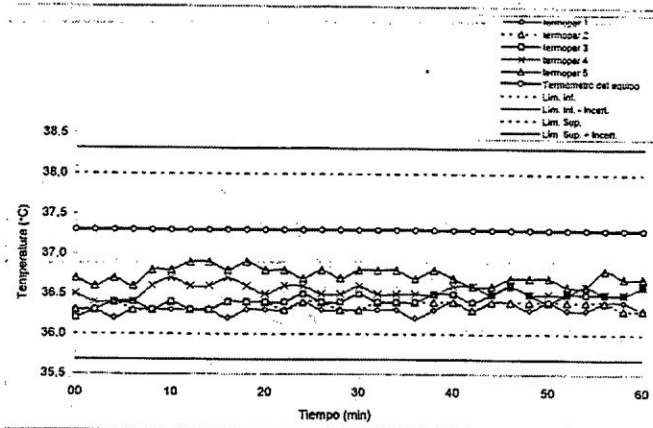
LABORATORIO DE CALIBRACIÓN ACREDITADO POR  
EL ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACIÓN  
INDECOPI - SNA CON REGISTRO N° LC-001



Registro N° LC-001

Certificado de Calibración N° TC-0431-2014  
Pág. 3 de 5

TEMPERATURA DE TRABAJO 37 °C

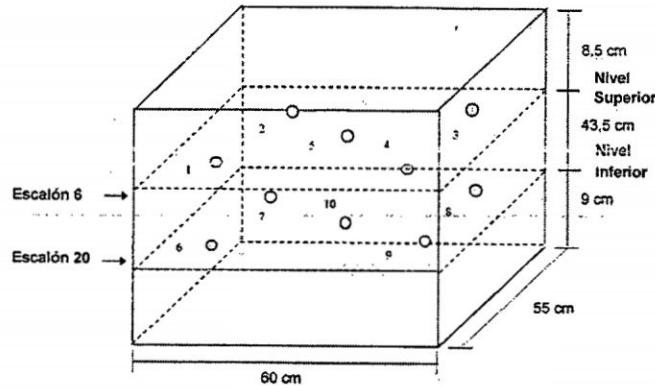


METROLOGIA E INGENIERIA LINO S.A.C.

Oficina (Ventas - Recepción - Entrega): Av. Venezuela 2040 - Lima - Lima Central Telf.: (511) 713-9066 / 713-9080 Nextel: 109\*8846 RPM: # 999048181  
Consulta Técnica: Central Telf.: 713-9070 / 713-9071 RPM: \*481579 Nextel: 832\*3234 - E-mail: ventas@metroil.com.pe / web: www.metroil.com.pe

F-M-084 / Mar 2011 / Rev. 05

12. Distribución de termopares en el equipo



- Los termopares 5 y 10 se ubicaron sobre el centro de sus respectivos niveles.
- Los demás termopares se ubicaron a 12 cm de las paredes laterales y a 10 cm del fondo y frente del equipo.
- Los termopares del nivel superior se ubicaron a 1,5 cm por encima de la altura más alta que emplea el usuario.
- Los termopares del nivel inferior se ubicaron a 1,5 cm por debajo de la parrilla más baja que emplea el usuario.
- Los escalones indican la posición de las parrillas.

13. Observaciones

- Se adjunta una etiqueta autoadhesiva con la indicación "CALIBRADO".
- Antes de la calibración no se realizó ningún tipo de ajuste.
- La calibración se efectuó 2 horas después que se cerró la puerta y se encendió el equipo.
- Durante la calibración y bajo las condiciones en que esta ha sido hecha, el medio isoterma CUMPLE con los límites especificados de temperatura.
- El controlador del equipo se programó en 37,3 °C para la temperatura de trabajo indicada en el ítem 4.
- La incertidumbre expandida de la medición se ha obtenido multiplicando la incertidumbre estándar de la medición por el factor de cobertura  $k = 2$  que, para una distribución normal corresponde a una probabilidad de cobertura de aproximadamente 95 %.
- (\*) La carga estaba constituida por 2 gradillas de metal conteniendo 69 tubos de ensayo, 3 recipientes de plástico y 32 placas petri.



METROLOGIA E INGENIERIA LINO S.A.C.

Oficina (Ventas - Recepción - Entrega): Av. Venezuela 2040 - Lima - Lima Central Telf.: (511) 713-9066 / 713-9080 Nextel: 109\*8846 RPM: # 999048181  
Consulta Técnica: Central Telf.: 713-9070 / 713-9071 RPM: \*481579 Nextel: 832\*3234 - E-mail: ventas@metroil.com.pe / web: www.metroil.com.pe

F-M-084 / Mar 2011 / Rev. 05





LABORATORIO DE CALIBRACIÓN ACREDITADO POR  
EL ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACIÓN  
INDECOPI - SNA CON REGISTRO N° LC-001



Registro N° LC-001

**CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN N° TC-0425-2014**  
**CON VALOR OFICIAL SEGÚN CÉDULA DE NOTIFICACIÓN N° 191.2011/SNA-INDECOPI**

Fecha de Emisión: 2014-05-12

EXP.: 38917  
Pág. 1 de 9

1. **Solicitante** : CERTIFICACIONES DEL PERÚ S.A.
2. **Dirección** : Av. Santa Rosa N° 601 La Perla -  
Callao
3. **Equipo calibrado** : INCUBADORA
  - **Marca / Fabricante** : MMM
  - **Identificación** : 2518
  - **Modelo** : LSIS - B2V/IC55
  - **Serie** : C 091472
  - **Procedencia** : Republica Checa
  - **Ventilación** : Natural
  - **Ubicación** : Laboratorio de Microbiología - Sala de  
Incubadoras
4. **Temperatura de trabajo** : ( 25 °C; 28 °C y 30 °C ) ± 1 °C
5. **Lugar de calibración** : Instalaciones de Certificaciones del  
Perú S.A.
6. **Fecha de calibración** : 2014-04-25
7. **Método de calibración**  
La calibración se realizó por comparación directa según el PC-013: 2°  
Ed. "Procedimiento para la calibración o caracterización de medios  
isotermos con aire como medio termostático" del SNM INDECOPI.
8. **Trazabilidad**  
Los resultados de la calibración tienen trazabilidad a los Patrones  
Nacionales del SNM - INDECOPI. Se utilizó el siguiente instrumento  
patrón:  
Termómetro con código IT-154 con 10 temporales de códigos K154-41 al K154-50  
con Certificado de Calibración N° T-0077-2014 de METROIL S.A.C.
9. **Condiciones de calibración**  
Temperatura ambiental : Inic.: 22,2 °C ; Fin.: 22,0 °C  
Humedad ambiental : Inic.: 65,6 % H.R. ; Fin.: 65,6 % H.R.  
Volumen Interior : 40 % de carga (\*)
10. **Instrumentos de medición del equipo**

Nombre	Alcance de Indicación	División Mínima	Tipo
Termómetro Controlador	10,0 °C a 100,0 °C	0,1 °C	Digital

Los resultados del certificado son válidos solo para el objeto calibrado y se refieren al momento y condiciones en que se realizaron las mediciones y no deben utilizarse como certificado de conformidad con normas de producto.

Se recomienda al usuario recalibrar el equipo a intervalos adecuados, los cuales deben ser elegidos con base en las características del trabajo realizado, el mantenimiento, conservación y el tiempo de uso del equipo y del instrumento de medición.

METROIL S.A.C. no se responsabiliza de los perjuicios que pueda ocasionar el uso inadecuado de este equipo, ni de una incorrecta interpretación de los resultados de la calibración aquí declarados.

Este certificado de calibración es trazable a patrones nacionales e internacionales, los cuales realizan las unidades de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI).

Este certificado de calibración no podrá ser reproducido parcialmente, excepto con autorización previa por escrito de METROIL S.A.C.

El certificado de calibración no es válido sin la "firma" del responsable técnico de METROIL S.A.C.



JUAN C. BARTOLO CHUQUIBALA  
Jefe del Laboratorio 4



Ing. MARCO A. MONTALVO CABREJOS  
Gerente del Servicio Metroológico

**METROLOGIA E INGENIERIA LINO S.A.C.**

Oficina (Ventas - Recepción - Entrega): Av. Venezuela 2040 - Lima - Lima Central Telf.: (511) 713-9066 / 713-9080 Nextel: 109\*8846 RPM: # 999048181  
Consulta Técnica: Central Telf.: 713-9070 / 713-9071 RPM: \*481579 Nextel: 832\*3234 - E-mail: ventas@metroil.com.pe / web: www.metroil.com.pe

F-M-084 / Mar 2011 / Rev. 05



LABORATORIO DE CALIBRACIÓN ACREDITADO POR  
EL ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACIÓN  
INDECOPI - SNA CON REGISTRO N° LC-001



Registro N° LC-001

Certificado de Calibración N° TC-0425-2014  
Pág. 2 de 8

11. Resultados:

CALIBRACIÓN PARA 25 °C

TIEMPO (min.)	Temperatura del espacio	TEMPERATURA EN LAS POSICIONES DE MEDICIÓN (°C)										T prom. (°C)	T max - T min (°C)
		NIVEL SUPERIOR					NIVEL INFERIOR						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
00	23,6	25,4	25,5	25,4	25,4	25,4	25,4	25,5	25,4	25,3	25,3	25,4	0,2
02	23,6	25,4	25,5	25,3	25,4	25,4	25,4	25,5	25,4	25,3	25,3	25,4	0,2
04	23,6	25,4	25,4	25,4	25,4	25,4	25,4	25,3	25,5	25,4	25,3	25,4	0,2
06	23,6	25,4	25,4	25,4	25,3	25,4	25,3	25,4	25,5	25,2	25,2	25,4	0,3
08	23,6	25,4	25,5	25,5	25,4	25,5	25,4	25,5	25,4	25,5	25,3	25,3	0,2
10	23,6	25,5	25,5	25,4	25,4	25,4	25,3	25,4	25,3	25,2	25,2	25,4	0,3
12	23,6	25,4	25,5	25,4	25,4	25,4	25,4	25,4	25,4	25,3	25,3	25,2	0,3
14	23,6	25,4	25,5	25,4	25,4	25,5	25,3	25,5	25,4	25,2	25,3	25,4	0,3
16	23,6	25,5	25,6	25,5	25,5	25,4	25,3	25,5	25,4	25,3	25,3	25,4	0,3
18	23,6	25,4	25,5	25,4	25,4	25,4	25,4	25,4	25,4	25,4	25,3	25,2	0,3
20	23,6	25,4	25,5	25,4	25,4	25,4	25,4	25,4	25,4	25,4	25,3	25,2	0,3
22	23,6	25,4	25,6	25,4	25,4	25,4	25,4	25,4	25,4	25,4	25,2	25,2	0,4
24	23,6	25,4	25,5	25,4	25,4	25,4	25,3	25,5	25,3	25,3	25,3	25,4	0,3
26	23,6	25,5	25,5	25,4	25,5	25,4	25,3	25,5	25,3	25,2	25,2	25,4	0,3
28	23,6	25,4	25,5	25,5	25,4	25,5	25,3	25,4	25,4	25,3	25,2	25,4	0,3
30	23,6	25,5	25,6	25,5	25,5	25,5	25,3	25,5	25,2	25,3	25,3	25,4	0,2
32	23,6	25,4	25,5	25,5	25,4	25,4	25,3	25,4	25,3	25,3	25,3	25,4	0,4
34	23,6	25,4	25,5	25,5	25,4	25,4	25,3	25,5	25,3	25,3	25,3	25,4	0,2
36	23,6	25,5	25,6	25,4	25,5	25,4	25,4	25,5	25,4	25,2	25,3	25,4	0,4
38	23,6	25,4	25,6	25,4	25,5	25,4	25,4	25,5	25,4	25,2	25,3	25,4	0,4
40	23,7	25,4	25,6	25,5	25,5	25,4	25,5	25,5	25,3	25,2	25,3	25,4	0,4
42	23,6	25,5	25,6	25,4	25,4	25,4	25,4	25,5	25,4	25,3	25,3	25,4	0,3
44	23,6	25,4	25,5	25,4	25,4	25,4	25,4	25,5	25,4	25,3	25,3	25,4	0,3
46	23,7	25,4	25,5	25,4	25,4	25,5	25,5	25,5	25,4	25,3	25,3	25,4	0,3
48	23,6	25,5	25,6	25,5	25,5	25,4	25,4	25,5	25,3	25,2	25,3	25,4	0,3
50	23,6	25,5	25,5	25,5	25,5	25,4	25,4	25,5	25,4	25,2	25,3	25,4	0,4
52	23,6	25,4	25,5	25,4	25,4	25,4	25,3	25,5	25,4	25,4	25,3	25,5	0,3
54	23,6	25,4	25,5	25,4	25,4	25,3	25,4	25,5	25,4	25,4	25,3	25,4	0,3
56	23,6	25,5	25,5	25,4	25,4	25,5	25,4	25,5	25,3	25,3	25,5	25,4	0,2
58	23,6	25,5	25,6	25,5	25,5	25,3	25,3	25,4	25,4	25,4	25,4	25,4	0,2
60	23,6	25,5	25,6	25,5	25,5	25,5	25,3	25,5	25,4	25,4	25,4	25,5	0,3
T.PROM	23,6	25,4	25,5	25,4	25,4	25,4	25,4	25,5	25,4	25,3	25,3	25,4	
T.MAX	23,7	25,5	25,6	25,5	25,5	25,5	25,5	25,5	25,5	25,5	25,5	25,5	
T.MIN	23,6	25,4	25,4	25,3	25,3	25,3	25,3	25,4	25,2	25,2	25,2		
DTT	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2		

Parámetro	Valor (°C)	Incertidumbre Expandida (°C)
Máxima Temperatura Medida	25,6	0,26
Mínima Temperatura Medida	25,2	0,31
Desviación de Temperatura en el Tiempo	0,3	0,1
Desviación de Temperatura en el Espacio	0,2	0,4
Estabilidad Medida (±)	0,15	0,04
Uniformidad Medida	0,4	0,4

T. PROM: Promedio de la temperatura en una posición de medición durante el tiempo de calibración.  
T prom: Promedio de las temperaturas en las diez posiciones de medición para un instante dado.  
T. MAX: Temperatura máxima  
T. MIN: Temperatura mínima  
DTT: Desviación de Temperatura en el Tiempo.

Para cada posición de medición su "desviación de temperatura en el tiempo" DTT está dada por la diferencia entre la máxima y la mínima temperatura registradas en dicha posición.  
Entre dos posiciones de medición su "desviación de temperatura en el espacio" está dada por la diferencia entre los promedios de temperaturas registradas en ambas posiciones.



METROLOGIA E INGENIERIA LINO S.A.C.

Oficina (Ventas - Recepción - Entrega): Av. Venezuela 2040 - Lima - Lima Central Telf.: (511) 713-9066 / 713-9080 Nextel: 109\*8846 RPM: # 999048181  
Consulta Técnica: Central Telf.: 713-9070 / 713-9071 RPN: \*481579 Nextel: 832\*3234 - E-mail: ventas@metroll.com.pe / web: www.metroll.com.pe

E.M.084 / Mar 2014 / Rev. 05

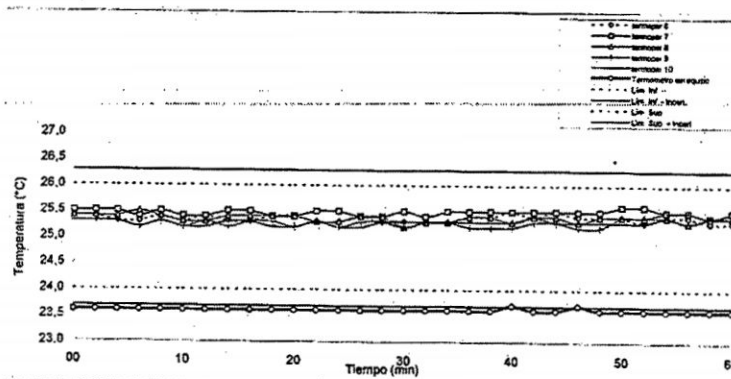
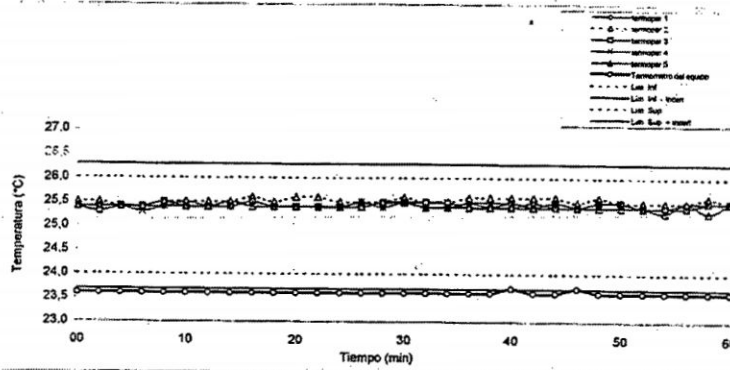


LABORATORIO DE CALIBRACIÓN ACREDITADO POR  
EL ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACIÓN  
INDECOPI - SNA CON REGISTRO N° LC-001



Certificado de Calibración N° TC-0425-2014  
Pág. 5 de 9

TEMPERATURA DE TRABAJO 25 °C

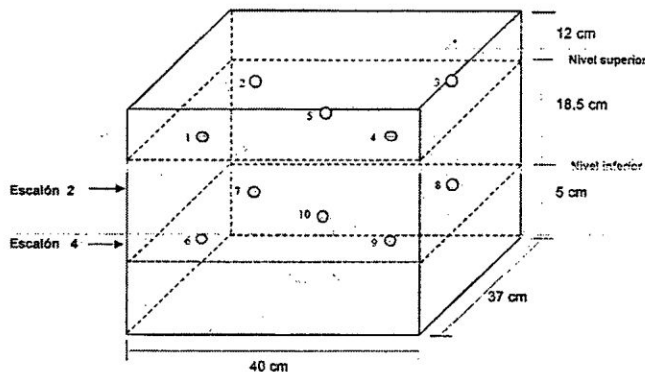


METROLOGIA E INGENIERIA LINO S.A.C.

Oficina (Ventas - Recepción - Entrega): Av. Venezuela 2040 - Lima - Lima Central Telf.: (511) 713-9066 / 713-9080 Nextel: 109\*8846 RPM: # 999048181  
Consulta Técnica: Central Telf.: 713-9070 / 713-9071 RPM: \*481579 Nextel: 832\*3234 - E-mail: ventas@metroil.com.pe / web: www.metroil.com.pe

F-M-084 / Mar 2011 / Rev. 05

12. Distribución de termopares en el equipo



- Los termopares 5 y 10 se ubicaron sobre el centro de sus respectivos niveles.
- Los demás termopares se ubicaron a 6 cm de las paredes laterales y a 5 cm del fondo y frente del equipo.
- Los termopares del nivel superior se ubicaron a 1,5 cm por encima de la altura más alta que emplea el usuario.
- Los termopares del nivel inferior se ubicaron a 1,5 cm por debajo de la pantalla más baja que emplea el usuario.
- Los escalones indican la posición de las pantallas.

13. Observaciones

- Se adjunta una etiqueta autoadhesiva con la indicación "CALIBRADO".
- Antes de la calibración no se realizó ningún tipo de ajuste.
- La calibración se efectuó 140 minutos después que se cerró la puerta y se encendió el equipo.
- Durante la calibración y bajo las condiciones en que esta ha sido hecha, el medio isoterma CUMPLE con los límites especificados de las temperaturas.
- El controlador del equipo se programó en 23,6 °C; 26,8 °C y 28,9 °C para las temperaturas de trabajo indicadas en el ítem 4.
- La incertidumbre expandida de la medición se ha obtenido multiplicando la incertidumbre estándar de la medición por el factor de cobertura  $k = 2$  que, para una distribución normal corresponde a una probabilidad de cobertura de aproximadamente 95 %.
- (\*) La carga estaba constituida por 3 placas petri.



METROLOGIA E INGENIERIA LINO S.A.C.

Oficina (Ventas - Recepción - Entrega): Av. Venezuela 2040 - Lima - Lima Central Telf.: (511) 713-9066 / 713-9080 Nextel: 109\*8846 RPM: # 999048181  
Consulta Técnica: Central Telf.: 713-9070 / 713-9071 RPM: \*481579 Nextel: 832\*3234 - E-mail: ventas@metroil.com.pe / web: www.metroil.com.pe

F-M-084 / Mar 2011 / Rev. 05



## Anexo 8. Carta de control de temperatura y humedad ambiental.

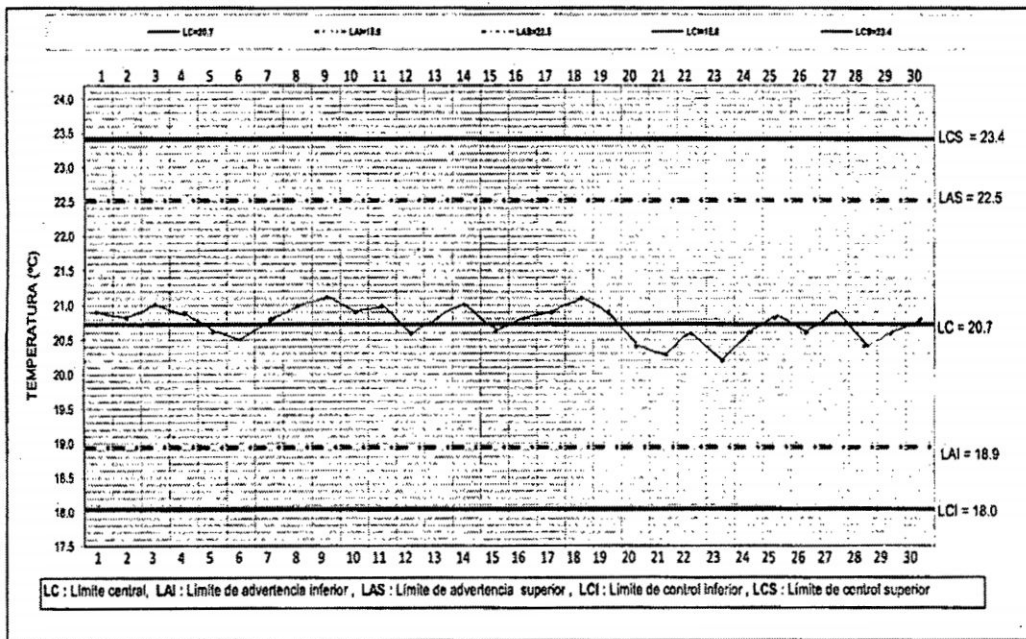


CARTA DE CONTROL: TEMPERATURA  HUMEDAD

ÁREA: Laboratorio de Microbiología - Sala de Pasos

CÓDIGO DE EQUIPO DE MEDICIÓN: T-48

NRO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Temperatura (°C)	20.9	20.4	21.0	20.8	20.6	20.5	20.8	21.0	20.9	20.9	20.9	20.9	20.8	21.0	20.6	20.8	20.9	21.1	20.4	20.4	20.3	20.6	20.7	20.5	20.8	20.8	20.9	20.4	20.6	20.8
Fecha	13.10.21	13.10.22	13.10.23	13.10.24	13.10.25	13.10.26	13.10.27	13.10.28	13.10.29	13.10.30																				



Analista Responsable:

Vo Bo Jefe de Sección / Supervisor:

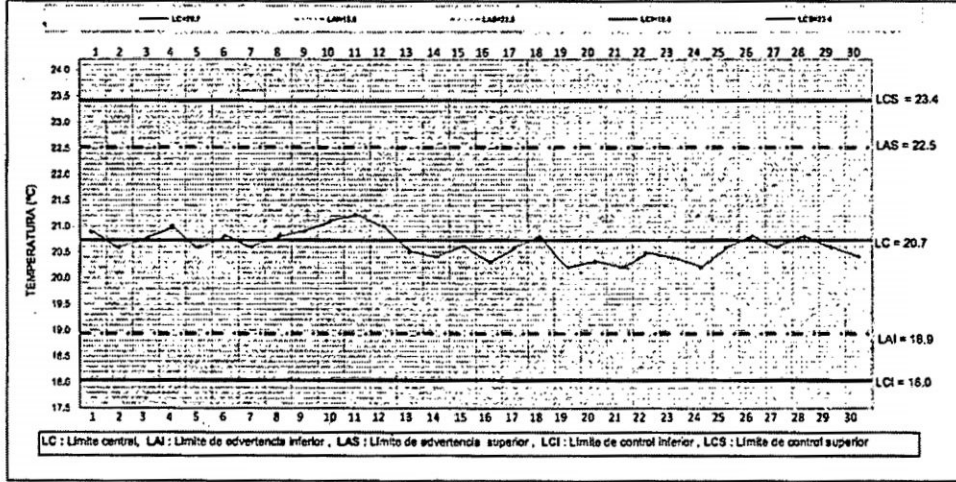
LE-R-CTH  
Versión 02  
2010-09-21



CARTA DE CONTROL: TEMPERATURA  HUMEDAD

ÁREA: Laboratorio de Microbiología - Sala de Pases CÓDIGO DE EQUIPO DE MEDICIÓN: T-48

NRO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Temperatura (°C)	20.4	20.6	20.7	20.8	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9
Fecha	13-11-01	13-11-02	13-11-03	13-11-04	13-11-05	13-11-06	13-11-07	13-11-08	13-11-09	13-11-10	13-11-11	13-11-12	13-11-13	13-11-14	13-11-15	13-11-16	13-11-17	13-11-18	13-11-19	13-11-20	13-11-21	13-11-22	13-11-23	13-11-24	13-11-25	13-11-26	13-11-27	13-11-28	13-11-29	13-11-30



Analista Responsable: *[Signature]*

Ve Bo Jefe de Sección / Supervisor: *[Signature]*

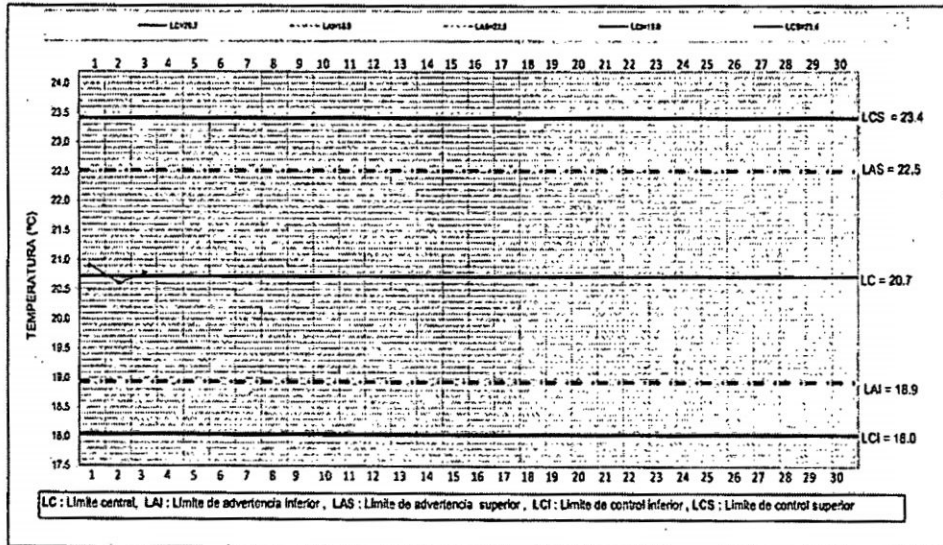
LE-R-CTH  
Versión 02  
2010-09-21



CARTA DE CONTROL: TEMPERATURA  HUMEDAD

ÁREA: Laboratorio de Microbiología - Sala de Pases CÓDIGO DE EQUIPO DE MEDICIÓN: T-48

NRO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Temperatura (°C)	20.4	20.4	20.5																											
Fecha	13-10-31																													



Analista Responsable: *[Signature]*

Ve Bo Jefe de Sección / Supervisor: *[Signature]*

LE-R-CTH  
Versión 02  
2010-09-21

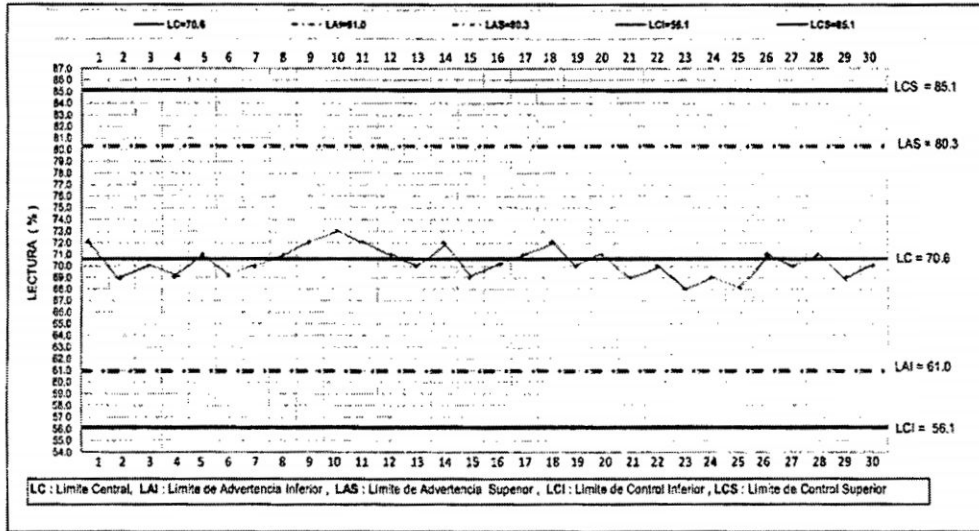


CARTA DE CONTROL: TEMPERATURA  HUMEDAD

ÁREA: Lab. de Microbiología - Sala de pasos

CÓDIGO DE EQUIPO DE MEDICIÓN: T-48

NRO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
HR (%)	72	69	70	68	71	69	70	71	72	73	72	71	70	72	68	70	71	72	70	71	69	70	68	69	68	71	70	71	69	70
Fecha	13.10.21	13.10.21	13.10.21	13.10.21	13.10.21	13.10.21	13.10.21	13.10.21	13.10.21	13.10.21	13.10.21	13.10.21	13.10.21	13.10.21	13.10.21	13.10.21	13.10.21	13.10.21	13.10.21	13.10.21	13.10.21	13.10.21	13.10.21	13.10.21	13.10.21	13.10.21	13.10.21	13.10.21	13.10.21	



Analista Responsable: *[Signature]*

Vo Bo Jefe de Sección / Supervisor: *[Signature]*

LE-R-CTH  
Versión 02  
2010-09-21

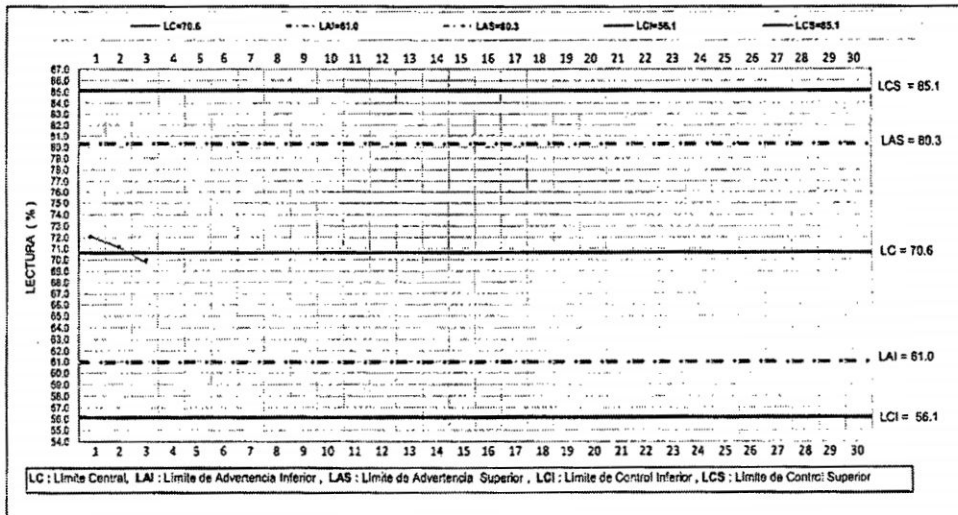


CARTA DE CONTROL: TEMPERATURA  HUMEDAD

ÁREA: Lab. de Microbiología - Sala de pasos

CÓDIGO DE EQUIPO DE MEDICIÓN: T-48

NRO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
HR (%)	72	71	70																											
Fecha	13.10.21																													



Analista Responsable: *[Signature]*

Vo Bo Jefe de Sección / Supervisor: *[Signature]*

LE-R-CTH  
Versión 02  
2010-09-21

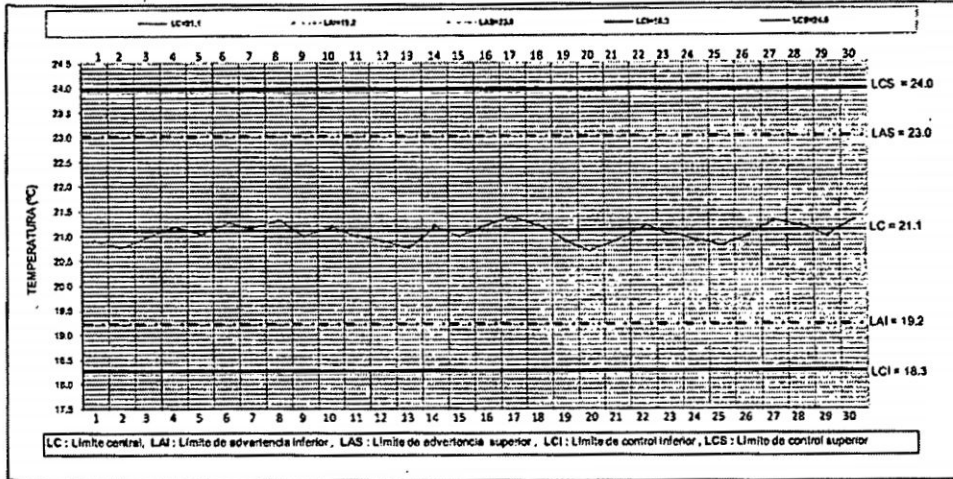


CARTA DE CONTROL: TEMPERATURA  HUMEDAD

ÁREA: Laboratorio de Microbiología - Sala de Siembra

CÓDIGO DE EQUIPO DE MEDICIÓN: T-47

NRO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
Temperatura (°C)	20.9	20.8	21.0	21.1	21.2	21.3	21.2	21.3	21.4	21.5	21.6	21.4	21.5	21.7	21.7	21.5	21.7	21.9	21.7	21.6	21.5	21.6	21.7	21.8	21.6	21.7	21.7	21.8	21.8	21.7	21.8
Fecha	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	15-10-21	



Analista Responsable:

Vo Bo Jefe de Sección / Supervisor:

LE-R-CTH  
Versión 02  
2010-09-21

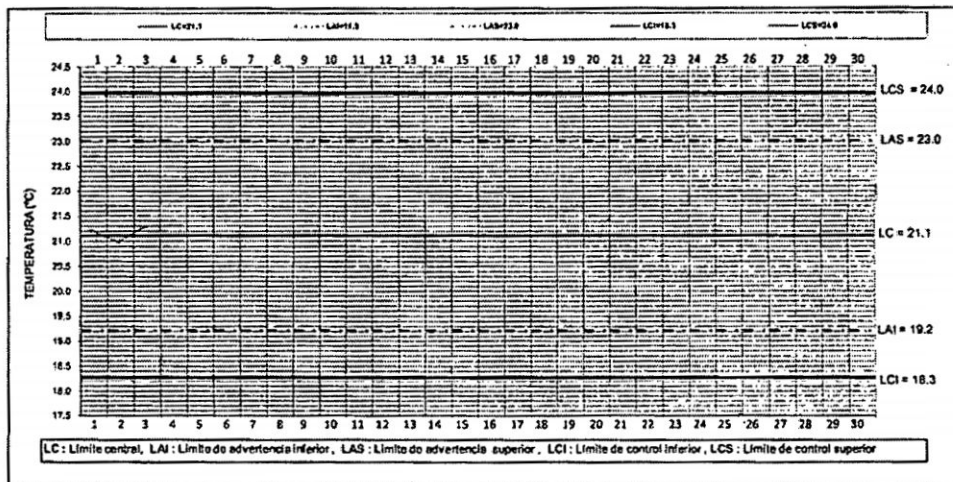


CARTA DE CONTROL: TEMPERATURA  HUMEDAD

ÁREA: Laboratorio de Microbiología - Sala de Siembra

CÓDIGO DE EQUIPO DE MEDICIÓN: T-47

NRO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Temperatura (°C)	21.2	21.0	21.3																											
Fecha	13-10-21																													



Analista Responsable:

Vo Bo Jefe de Sección / Supervisor:

LE-R-CTH  
Versión 02  
2010-09-21

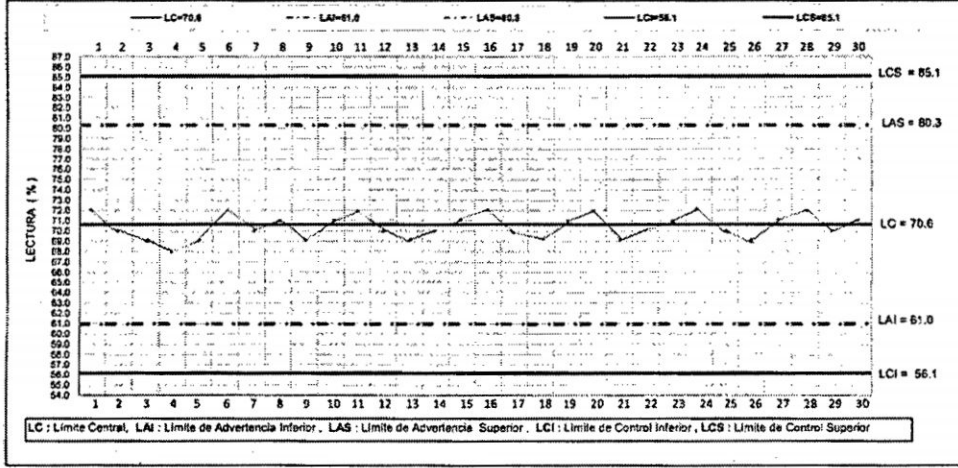


CARTA DE CONTROL: TEMPERATURA  HUMEDAD

ÁREA: Lab. de Microbiología - Sala de siembra

CÓDIGO DE EQUIPO DE MEDICIÓN: T-47

HRO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
HR (%)	72	70	69	69	69	70	71	69	71	72	70	69	70	71	72	70	69	71	72	69	71	72	70	69	71	72	70	69	71	72	70
Fecha	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	12-10-21	



Analista Responsable: *[Signature]*

Vo Bo Jefe de Sección / Supervisor: *[Signature]*

LE-R-CTH  
Versión 02  
2010-09-21

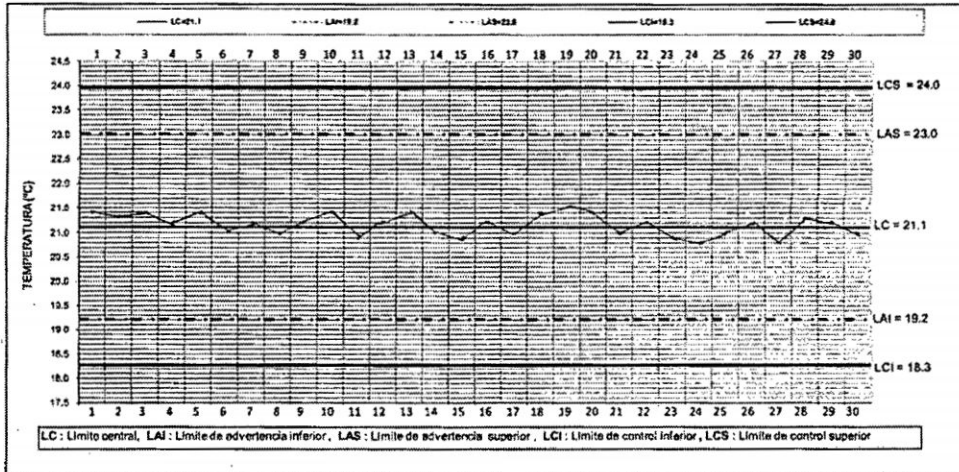


CARTA DE CONTROL: TEMPERATURA  HUMEDAD

ÁREA: Laboratorio de Microbiología - Sala de Siembra

CÓDIGO DE EQUIPO DE MEDICIÓN: T-47

HRO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Temperatura (°C)	21.4	21.3	21.4	21.4	21.4	21.5	21.2	21.0	21.2	21.4	21.5	21.4	21.4	21.6	21.2	21.0	21.4	21.4	21.4	21.0	21.2	21.4	21.0	21.4	21.0	21.4	21.2	21.2	21.0	
Fecha	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01	12-11-01



Analista Responsable: *[Signature]*

Vo Bo Jefe de Sección / Supervisor: *[Signature]*

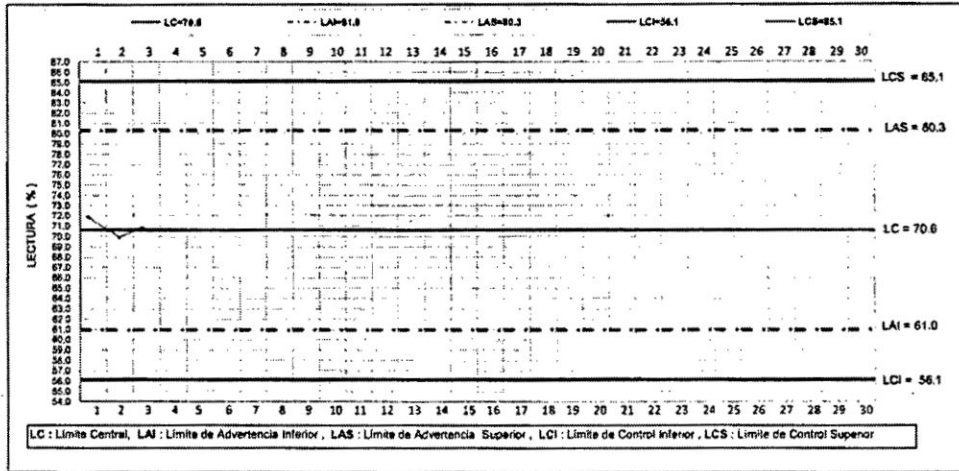
LE-R-CTH  
Versión 02  
2010-09-21



CARTA DE CONTROL: TEMPERATURA  HUMEDAD

ÁREA: Lab. de Microbiología - Sala de siembra CÓDIGO DE EQUIPO DE MEDICIÓN: T-47

HRO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
HR (%)	72	70	71																											
Fecha	13-10-21																													



Analista Responsable: *[Signature]*

Vo Bo Jefe de Sección / Supervisor: *[Signature]*

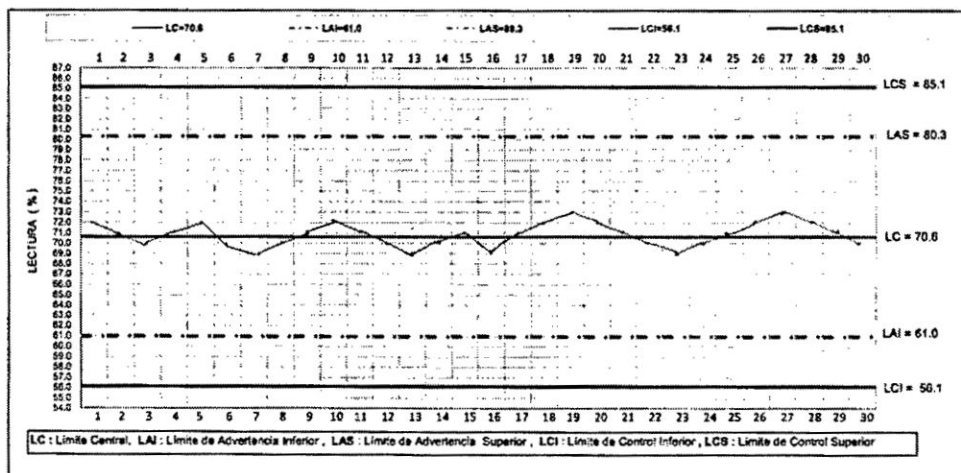
LE-R-CTH  
Versión 02  
2010-09-21



CARTA DE CONTROL: TEMPERATURA  HUMEDAD

ÁREA: Lab. de Microbiología - Sala de siembra CÓDIGO DE EQUIPO DE MEDICIÓN: T-47

HRO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
HR (%)	72	71	70	71	72	70	69	70	71	72	71	70	69	70	71	69	71	72	71	70	69	70	71	72	71	70	69	70	71	70
Fecha	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	



Analista Responsable: *[Signature]*

Vo Bo Jefe de Sección / Supervisor: *[Signature]*

LE-R-CTH  
Versión 02  
2010-09-21

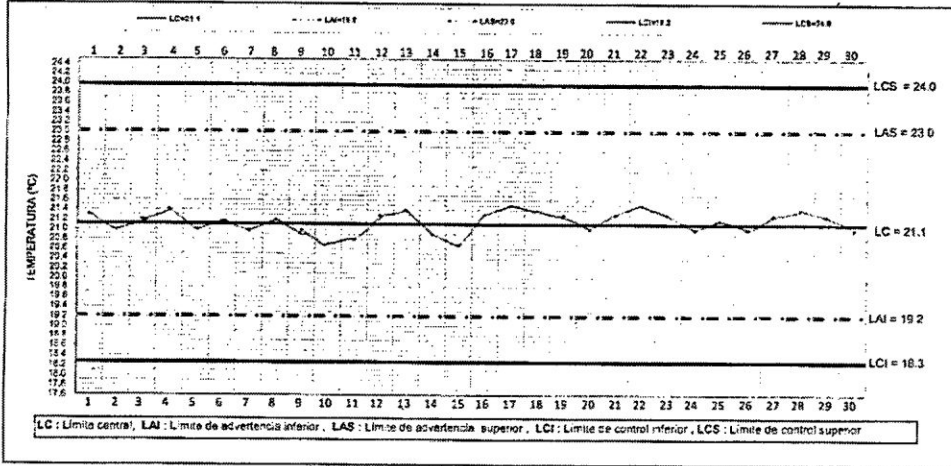


CARTA DE CONTROL: TEMPERATURA  HUMEDAD

ÁREA: Laboratorio de Microbiología - Sala de Incubadoras

CÓDIGO DE EQUIPO DE MEDICIÓN: T-42

NRO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Temperatura (°C)	21.0	21.6	21.2	21.1	21.0	21.2	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0
Fecha	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	13-10-21	



Analista Responsable: *[Signature]*

Va Bo Jefe de Sección / Supervisor: *[Signature]*

LE-R-CTM  
Versión 02  
2010-09-21

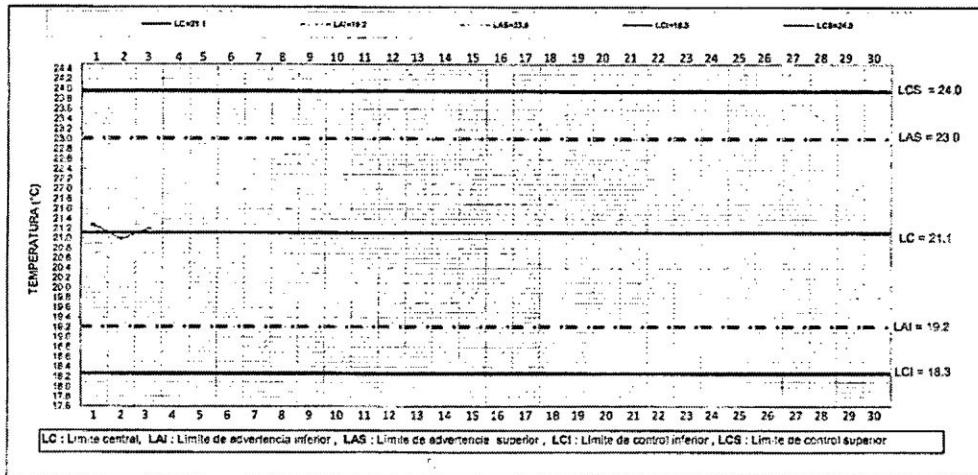


CARTA DE CONTROL: TEMPERATURA  HUMEDAD

ÁREA: Laboratorio de Microbiología - Sala de Incubadoras

CÓDIGO DE EQUIPO DE MEDICIÓN: T-42

NRO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Temperatura (°C)	21.0	21.0	21.0	21.0																										
Fecha	13-10-21																													



Analista Responsable: *[Signature]*

Va Bo Jefe de Sección / Supervisor: *[Signature]*

LE-R-CTM  
Versión 02  
2010-09-21

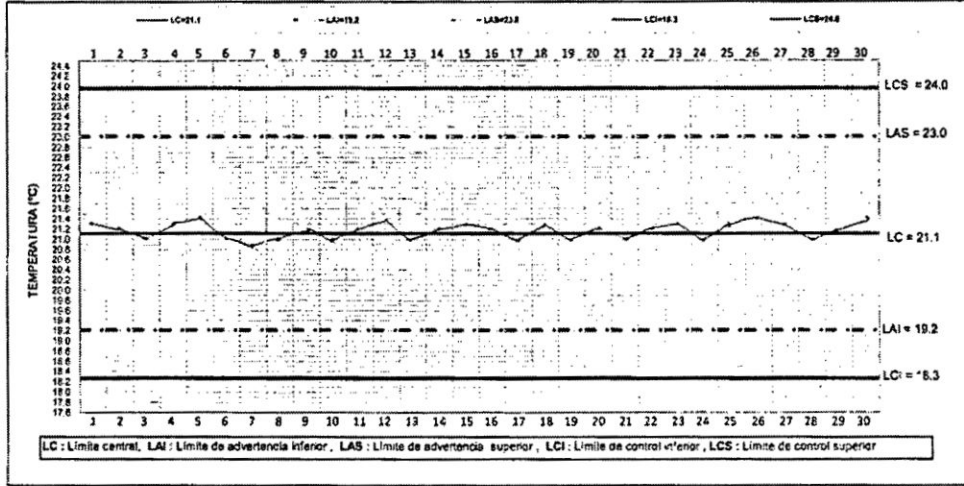


CARTA DE CONTROL: TEMPERATURA  HUMEDAD

ÁREA: Laboratorio de Microbiología - Sala de Incubadoras

CÓDIGO DE EQUIPO DE MEDICIÓN: T-42

NRO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Temperatura (°C)	21.3	21.2	21.0	21.3	21.4	21.0	21.4	21.0	21.3	21.0	21.4	21.0	21.3	21.0	21.4	21.0	21.3	21.0	21.4	21.0	21.3	21.0	21.4	21.0	21.3	21.0	21.4	21.0	21.3	21.0
Fecha	13.11.01	15.11.07	18.11.03	13.11.07	13.11.05	13.11.06	13.11.07	13.11.08	13.11.07	13.11.08	13.11.07	13.11.08	13.11.07	13.11.08	13.11.07	13.11.08	13.11.07	13.11.08	13.11.07	13.11.08	13.11.07	13.11.08	13.11.07	13.11.08	13.11.07	13.11.08	13.11.07	13.11.08	13.11.07	



Analista Responsable: [Signature] Vo Bo Jefe de Sección / Supervisor: [Signature]

LE-R-07H  
Versión: C2  
2010-01-21

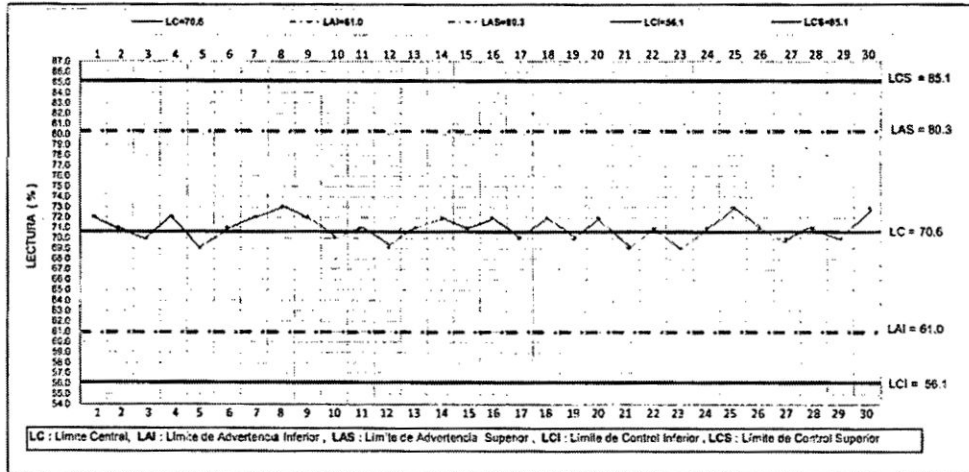


CARTA DE CONTROL: TEMPERATURA  HUMEDAD

ÁREA: Lab. de Microbiología - Sala de Incubadoras

CÓDIGO DE EQUIPO DE MEDICIÓN: T-42

NRO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
HR (%)	72.3	71.7	70.2	72.4	71.1	72.3	70.7	72.1	70.4	71.6	70.1	72.3	70.7	72.1	70.4	71.6	70.1	72.3	70.7	72.1	70.4	71.6	70.1	72.3	70.7	72.1	70.4	71.6	70.1	
Fecha	13.11.01	13.11.07	13.11.07	13.11.07	13.11.07	13.11.07	13.11.07	13.11.07	13.11.07	13.11.07	13.11.07	13.11.07	13.11.07	13.11.07	13.11.07	13.11.07	13.11.07	13.11.07	13.11.07	13.11.07	13.11.07	13.11.07	13.11.07	13.11.07	13.11.07	13.11.07	13.11.07	13.11.07	13.11.07	



Analista Responsable: [Signature] Vo Bo Jefe de Sección / Supervisor: [Signature]

LE-R-07H  
Versión: J2  
2010-09-11

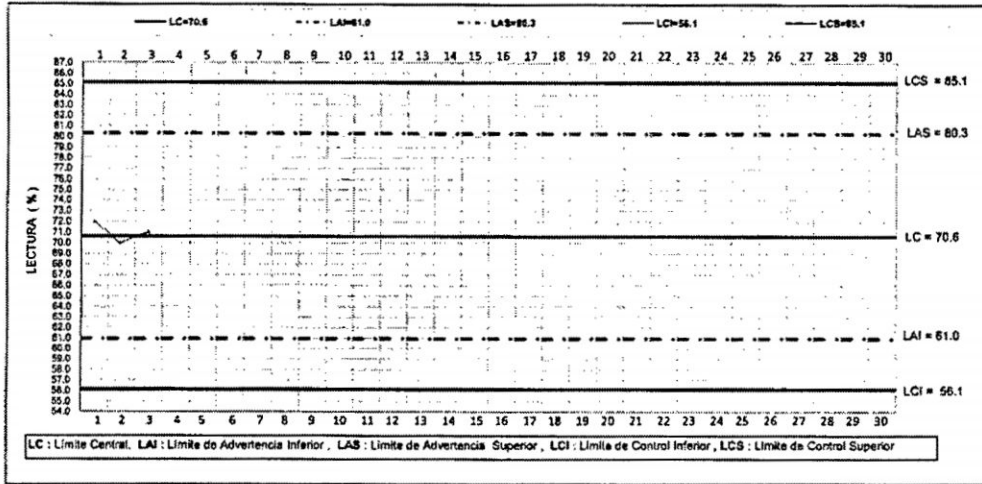


CARTA DE CONTROL: TEMPERATURA  HUMEDAD

ÁREA: Lab. de Microbiología - Sala de Incubadoras

CÓDIGO DE EQUIPO DE MEDICIÓN: T-42

NRO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
HR (%)	72.30	73.33																												
Fecha	12-10-21																													



Analista Responsable:

Vo Bo Jefe de Sección / Supervisor:

LE-R-CTH  
Versión 02  
2010-09-21

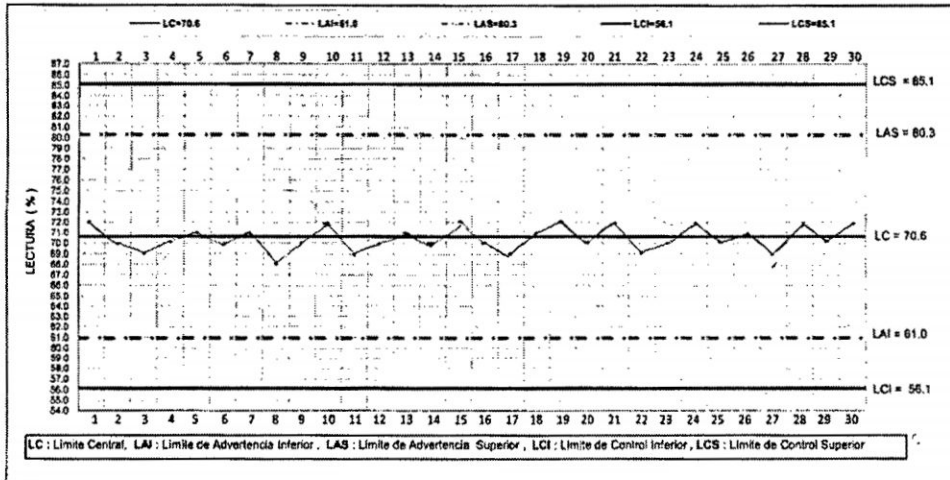


CARTA DE CONTROL: TEMPERATURA  HUMEDAD

ÁREA: Lab. de Microbiología - Sala de Incubadoras

CÓDIGO DE EQUIPO DE MEDICIÓN: T-42

NRO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
HR (%)	72.30	70.69	70.31	70.31	71.68	70.37	69.90	71.30	72.70	69.31	72.30	70.69	71.37	70.69	71.37	70.69	71.37	70.69	71.37	70.69	71.37	70.69	71.37	70.69	71.37	70.69	71.37	70.69	71.37	
Fecha	12-11-21	12-11-22	12-11-23	12-11-24	12-11-25	12-11-26	12-11-27	12-11-28	12-11-29	12-11-30	12-11-01	12-11-02	12-11-03	12-11-04	12-11-05	12-11-06	12-11-07	12-11-08	12-11-09	12-11-10	12-11-11	12-11-12	12-11-13	12-11-14	12-11-15	12-11-16	12-11-17	12-11-18	12-11-19	



Analista Responsable:

Vo Bo Jefe de Sección / Supervisor:

LE-R-CTH  
Versión 02  
2010-09-21

# Anexo 9. Resultados de la concentración del inóculo del microorganismo objetivo (*Listeria monocytogenes*) y del microorganismo no objetivo (*Escherichia coli*).



## ANÁLISIS DE ALIMENTOS

O/E
Nº DE LAB.

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

FECHA DE INICIO: 2013-09-25 HORA: 10:30:00  
 FECHA DE TÉRMINO: 2013-09-27

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS  
 ICMSF 2da. Edic. 1983 Vol. 1, Parte II, (Introducción de la versión original 1978)  
 Reimpresión 2000. Editorial Acribia

PROCESAMIENTO				RESULTADO																											
Diluyente: Agua peptonada	Lt	725	Control	L. monocytogenes					E. coli					n <sub>1</sub>					n <sub>2</sub>					n <sub>3</sub>							
Medio: Lich. Fecha de lectura	Incubación		-	+1	+2	+6	+7	+8	-1	-2	-6	-7	-8	-1	-2	-3	-4	-5	-1	-2	-3	-4	-5	-1	-2	-3	-4	-5			
A. Pile Count	613	F.L.	2013-09-27	30x1°C	48h30'	No																									
Lt																															
(1) Recuento en Placa de Aerobios Membrana UFCig																															
Cometes: Agar (C)																															
Diluyente (D)	Ambarzal (G)																														
Incididumbre																															
A. OGY																															
Lt	F.L.																														
2) Recuo. de Levaduras UFCig																															
Control de duplicados o paralelos																															
Control de diluciones consecutivas																															
Incididumbre																															
A. OGY																															
Lt	F.L.																														
2) Recuo. de Levaduras UFCig																															
Control de duplicados o paralelos																															
Control de diluciones consecutivas																															
Incididumbre																															
VRBA+GLUC																															
Lt	F.L.																														
VRBA+GLUC																															
Lt	F.L.																														
Glucosa (+)																															
Lt	F.L.																														
A. Nutri L.																															
Oxidasa (-) Lt.																															
Nº de colonias que confirman del total de colonias seleccionadas (picadas) de agar VRBA (por menos 2 colonias)																															
Colonias confirmadas																															
2) Recuo. de levaduras UFCig																															
Control de duplicados o paralelos																															
Control de diluciones consecutivas																															
Incididumbre																															
Cald. Tefecto mantil glicina																															
Lt	F.L.																														
Agar Baird Parker (BP)																															
Lt	F.L.																														
BHI Lt.																															
Plasma de conejo EDTA																															
Lt	F.L.																														
A. Azul de Toluidina DNA (+) Lt.																															
Tubos confirmados																															
(4) Recuo. S. aureus coagulase(-) NMPIg																															
Nº total de colonias seleccionadas de Agar BP (menos 5 por placa)																															
Nº total de colonias confirmadas																															

**Nota:** R = Resultado

A. Para la lectura de Recuento de los items (1), (2) y (3) seleccionan las placas que muestran entre 30 a 300 colonias, para el cálculo del número confirmado.

B. Contar las placas, hacer la Media aritmética, esperar en dos dígitos y multiplicar por el factor de dilución en base diez.

C. Recuento Estándar en placa estratificada (EPE).

D. Si las placas que tienen menos de 30 colonias el valor se expresa como Recuento Estándar en placa estratificada (EPE).

E. Si las placas tienen más de 300 colonias en 1/8 de unidad, multiplicar (EPE) por (coeficiente de 200 x 8) por el factor de dilución. Escribir el EPE superior (3) el valor.

F. Si en las placas son necesarias expresar el RI PE como inferior a 1 y 1 empujados por el factor de la dilución más concentrada.

G. En el nombre de duplicados o paralelos de placas (P) los valores obtenidos serán 4 para ser considerados como ACEPTADOS, valores se serán RECHAZADOS.

Honda:  $DP = (C_1 + C_2) / 2$

Donde:  $DP$  = el resultado que se compara con la tabla del Chi cuadrado al 95% de confianza  
 $C_1$  = es el número de colonias en la placa 1  
 $C_2$  = es el número de colonias en la placa 2

I. En el control de duplicados consecutivos (D) los valores obtenidos serán 4 para ser considerados como ACEPTADOS, valores se serán RECHAZADOS.

Donde se tiene:  $DP = (C_1 + C_2) / 2$

J.  $C_1$  = es el estadístico que se compara con la tabla del Chi cuadrado al 95% de confianza  
 $C_2$  = es la suma del número de colonias en las placas de mayor dilución  
 $C_3$  = es la suma del número de colonias en las placas de mayor dilución

K. Para item (3) hacer el promedio 3 colonias por placa para las pruebas de confirmación, realizar el cálculo de  $C_1$  y  $C_2$  antes de la confirmación.

L. Para item (4) los valores en los medios de cultivo se expresan en el Nº de tubos que muestran crecimiento y/o son positivos a las pruebas de confirmación.

M. Para la expresión de resultados utilizar dos cifras significativas, a partir del tercer dígito redondearlas por error. Si el tercer dígito empiezan con la letra en 5 o superior añadir una unidad al segundo dígito. por ejemplo: si el valor calculado fue 123000, este debe darse como 123000 (123 x 10<sup>3</sup>). Si el valor calculado es 93497 este debe darse como 94000 (94 x 10<sup>3</sup>).

HE-MI-4A  
 Version 10  
 2013-10-25

ANÁLISIS DE ALIMENTOS

O/E
Nº DE LAB.

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

FECHA DE INICIO: 2013-09-26 HORA: 10:50:00  
 FECHA DE TÉRMINO: 2013-09-28

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS  
 ICMSF 2da. Edic. 1983 Vol 1, Parte II, (Introducción de la versión original 1978)  
 Reimpresión: 2000 Editorial Acribia

PROCESAMIENTO				RESULTADO																								
Diluyente: Agua peptonada	LI	725	Control	L. monocitogenes					E. coli					n <sub>1</sub>					n <sub>2</sub>					n <sub>3</sub>				
Medio	Lots	Fecha de lectura	Incubación	-	+	-1	-2	-3	-4	-5	-1	-2	-3	-4	-5	-1	-2	-3	-4	-5	-1	-2	-3	-4	-5			
A. Placa Count				No aplica																								
LI	613	F.L.	2013-09-28	30±1°C	48h																							
(1) Recuento en Placa de Aerobios Mesófilos UFC/g				R																								
Cultivos: Agar (0)				D <sup>+</sup>																								
Disolvente (0) Ambiental (0)				e <sup>+</sup>																								
Incubación				R ±																								
A. OGY																												
LI	F.L.																											
(2) Rcto. de Mohos UFC/g				R																								
Control de duplicados o paralelos				D <sup>+</sup>																								
Control de diluciones consecutivas				e <sup>+</sup>																								
Incubación				R ±																								
A. OGY																												
LI	F.L.																											
(2) Rcto. de Levaduras UFC/g				R																								
Control de duplicados o paralelos				D <sup>+</sup>																								
Control de diluciones consecutivas				e <sup>+</sup>																								
Incubación				R ±																								
(2) Rcto. de Mohos y Levaduras UFC/g				R																								
Control de duplicados o paralelos				D <sup>+</sup>																								
Control de diluciones consecutivas				e <sup>+</sup>																								
Incubación				R ±																								
VRBA+GLUC																												
LI	F.L.																											
VRBA+GLUC																												
LI	F.L.																											
Gluc-sal (+)																												
LI	F.L.																											
A.Nutri LI																												
LI	F.L.																											
Oxidasa (-) LI																												
LI	F.L.																											
Nº de colonias que conforman el total de colonias seleccionadas (picadas) de agar VRBA (al menos 2 colonias)																												
Colonias confirmadas																												
25 Rcto por vietas en placa de Enterobacteriaceae (EFD)				R																								
Control de duplicados o paralelos				D <sup>+</sup>																								
Control de diluciones consecutivas				e <sup>+</sup>																								
Incubación				R ±																								
Cald. Telurito manitol glicina																												
LI	F.L.																											
Agar Baird Parker (BP)																												
LI	F.L.																											
BHI LI																												
LI	F.L.																											
Plasma de conejo EDTA																												
LI	F.L.																											
A. Azul de Toluidina (TIA+) LI																												
LI	F.L.																											
Tubos confirmados																												
(4) Rcto. S. aureus coagulasa (+) HMP/g				R																								
Nº total de colonias seleccionadas de Agar BP (al menos 5 por placa)																												
Nº total de colonias confirmadas																												

Para la lectura de Recuento de los ítems (1), (2) y (3) seleccionar las placas que contengan entre 30 a 300 colonias para el cálculo del número de colonias.

A. Contar las placas, hallar la Media aritmética, expresar en dos dígitos y multiplicar por el factor de dilución en base diez.

B. Recuento (estimar en placa estimada (REPE)).

1) Si las placas que tienen menos de 30 colonias el valor se expresa como Recuento Estimado en placa (REPE).

2) Si las placas tienen más de 300 colonias en 1/8 de sección, multiplicar 1000 (procedente de 200 x 5) por el factor de dilución. Expresar el REPE superior al valor.

3) Si en las placas no hay colonias expresar el REPE como inferior a (C) 1 multiplicado por el factor de la dilución más concentrada.

En el control de duplicados o paralelos de placas (D+) los valores obtenidos serán 4 para ser considerados como ACEPTADOS, valores >4 serán RECHAZADOS.

Donde se tiene: D<sup>+</sup> = (C<sub>1</sub> / C<sub>2</sub>) / C<sub>1</sub> + C<sub>2</sub>

Don: D<sup>+</sup> es el estadístico que se compara con la tabla del Chi cuadrado al 95% de confianza

C<sub>1</sub> es el número de colonias en la placa 1

C<sub>2</sub> es el número de colonias en la placa 2

En el control de diluciones consecutivas (D<sup>+</sup>) los valores obtenidos serán 4 para ser considerados como ACEPTADOS, valores >4 serán RECHAZADOS.

Donde se tiene: e<sup>+</sup> = (C<sub>1</sub> / C<sub>2</sub>) / (10C<sub>1</sub> / 10C<sub>2</sub> + C<sub>1</sub>)

e<sup>+</sup> es el estadístico que se compara con la tabla del Chi cuadrado al 95% de confianza

C<sub>1</sub> es la suma del número de colonias en las placas de menor dilución

C<sub>2</sub> es la suma del número de colonias en las placas de mayor dilución

Para ítem (3) tomar al menos 2 colonias por placa para los pruebas de confirmación, realizar el cálculo de D<sup>+</sup> y el antes de la confirmación.

Para ítem (4) los valores en los medios de cultivo expresan el Nº de tubos que muestran crecimiento y/o son positivos a los probios de confirmación.

Para la expresión de resultados utilizar dos cifras significativas, a partir del tercer dígito reemplazarlos por ceros. Si el tercer dígito empezando por la izquierda es 5 o superior añadir una unidad al segundo dígito, por ejemplo: si el valor obtenido fue 52300, este debe darse como 52000 (52 x 10<sup>3</sup>). Si el valor calculado es 83600 este debe darse como 84000 (84 x 10<sup>3</sup>).

**ANÁLISIS DE ALIMENTOS**

O/E
Nº DE LAB.

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

FECHA DE INICIO: 2013-09-27 HORA: 11:20:00  
 FECHA DE TÉRMINO: 2013-09-29

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS  
 ICMSF 2da. Edic. 1983 Vol. 1, Parte II. (traducción de la versión original 1978)  
 Reimpresión 2000 Editorial Acibía

PROCESAMIENTO				RESULTADO																									
Diluyente/Agua peptonada	LI	725	Control	L. monocitogenes			E. coli			n <sub>1</sub>					n <sub>2</sub>														
Método: Lote, Fecha de lectura	Inoculación	-	+	-1	-2	-6	-7	-8	-1	-2	-6	-7	-8	-1	-2	-3	-4	-5	-1	-2	-3	-4	-5	-1	-2	-3	-4	-5	
A. Placa Count	30x11°C	48h	No aplica	>300	37	4			>300	79	7																		
LI 613 F.L. 2013-09-29																													
(1) Recuento en Placa de Aerobios Mesófilos UFC/g			R	43 x 10 <sup>7</sup>			86 x 10 <sup>7</sup>																						
Control: Agr: (0)	30x11°C	48h	D <sup>2</sup>	1.4235			0.9883																						
Okazete (0) Ambiental (0)			d <sup>2</sup>	0.0269			0.0674																						
Incertidumbre			R ±																										
A. OGY	20-24°C	3-5 días	-																										
LI F.L.																													
(2) Rcto. de Mohos UFC/g			R																										
Control de duplicados o paralelos			D <sup>2</sup>																										
Control de diluciones consecutivas			d <sup>2</sup>																										
Incertidumbre			R ±																										
A. OGY	20-24°C	3-5 días	-																										
LI F.L.																													
(2) Rcto. de Levaduras UFC/g			R																										
Control de duplicados o paralelos			D <sup>2</sup>																										
Control de diluciones consecutivas			d <sup>2</sup>																										
Incertidumbre			R ±																										
(2) Rcto. de Mohos y levaduras UFC/g			R																										
Control de duplicados o paralelos			D <sup>2</sup>																										
Control de diluciones consecutivas			d <sup>2</sup>																										
Incertidumbre			R ±																										
VRBA+GLUC	35-37°C	24h																											
LI F.L.																													
VRBA+GLUC	35-37°C	20-24h																											
LI F.L.																													
Gluc-sal (+)																													
LI F.L.																													
A. Nutril LI																													
Oxifase (-) LI																													
Nº de colonias que conforman el total de colonias seleccionadas (picadas) de agar VRBA (a máxima 2 colonias)																													
Colonias confirmadas																													
Efecto por inóculo en placa en Enterobacteriaceas UFC/g			R																										
Control de duplicados o paralelos			D <sup>2</sup>																										
Control de diluciones consecutivas			d <sup>2</sup>																										
Incertidumbre			R ±																										
Coldo Telurio manitol glicina	35-37°C	24h																											
LI F.L.																													
Agar Baird Parker (BP)	35-37°C	30h																											
LI F.L.																													
BHI LI	35-37°C	24h																											
LI F.L.																													
Plasma de complejo EDTA	35-37°C	4 h																											
LI F.L.																													
A. Azul de Tetra (a-DNA (+)) LI	35-37°C	4 h																											
LI F.L.																													
Tubos confirmados																													
(4) Rcto. S. aureus coagulase (+) HMP/g			R																										
Nº total de colonias seleccionadas de Agar BP (phorus 5 por placa)																													
Nº total de colonias confirmadas																													

**Nota:**

**R = Resultado**

- Para la lectura de Recuento de los Items (1), (2) y (3) seleccionar las placas que entregan entre 30 a 300 colonias; para el cálculo del mismo considerar:
  - A. Contar las placas; hallar la Media aritmética, expresar en dos dígitos y multiplicar por el factor de dilución en base diez
  - B. Recuento Estándar en placa estimada (MPE)
  - C. Si las placas que tienen menos de 30 colonias el valor se expresa como Recuento Estándar en placa estimado (REPE)
  - D. Si las placas tienen más de 300 colonias en 1/5 de segundos, multiplicar 1600 (porcentaje de 200 x 8) por el factor de dilución. Expresar el REPE superior (o) al valor
  - E. Si en las placas no hay colonias erróneas: el REPE como inferior a (x) 1 multiplicado por el factor de dilución más concentrada.
- En el control de duplicados o paralelos (D<sup>2</sup>) los valores obtenidos serán 0 para ser considerados como ACEPTADOS, valores ≠ 0 serán RECHAZADOS.
- En el control de diluciones consecutivas (d<sup>2</sup>) los valores obtenidos serán 0 para ser considerados como ACEPTADOS, valores ≠ 0 serán RECHAZADOS.
- Debe ser:  $D^2 = (C_1/C_2) + C_2$
- Donde: D<sup>2</sup> = es el estadístico que se compara con la tabla del Chi cuadrado al 95% de confianza
- C<sub>1</sub> = el número de colonias en la placa 1
- C<sub>2</sub> = el número de colonias en la placa 2

**En el control de diluciones consecutivas (d<sup>2</sup>) los valores obtenidos serán 0 para ser considerados como ACEPTADOS, valores ≠ 0 serán RECHAZADOS.**

Donde se tiene:  $d^2 = (C_1/10C_2) + C_2$

C<sub>1</sub> = es el estadístico que se compara con la tabla del Chi cuadrado el 95% de confianza

C<sub>2</sub> = es la suma del número de colonias en las placas de menor dilución

C<sub>1</sub> = es la suma del número de colonias en las placas de mayor dilución

- Para Item (1) tomar al menor 2 colonias por placa para las pruebas de confirmación, realizar el cálculo de D<sup>2</sup> y d<sup>2</sup> antes de la confirmación.

- Para Item (4) los valores en los medios de cultivo expresan el Nº de tubos que muestran crecimiento (y) son positivos a las pruebas de confirmación.

- Para la expresión de resultados utilizar dos cifras significativas, a partir del tercer dígito reemplazados por ceros. Si el tercer dígito expresado por la literatura es 5 o superior añadir una unidad al segundo dígito; por ejemplo, si el valor calculado fue 523000, este debe darse como 520000 (52x10<sup>7</sup>). Si el valor calculado es 69000 este debe darse como 69000 (69x10<sup>4</sup>).

## Anexo 10. Pruebas estadísticas de los resultados preliminares de la validación secundaria.



### I. PRUEBAS ESTADÍSTICAS APLICADAS A LOS RESULTADOS

**Método:**

ISO 18593: 2004, Parte 8 y 9 excepto 8.1, 8.3.1, 8.3.3, 9.1, 9.2.3, RM- N° 461-2007/MINSA Parte 8.4 ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs. Guía técnica para el análisis microbiológico de superficies en contacto con alimentos y bebidas. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. Amendment 1:2004 Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data

**Determinación:** *Listeria monocytogenes*

**Producto :** Superficies Irregulares

**Analista 1:** Méloty Vera

#### ENSAYOS PRELIMINARES

##### RESULTADOS

Se analizaron 3 muestras inoculadas con *Listeria monocytogenes* por duplicado, y se comparan los resultados esperados con los obtenidos experimentalmente.

##### 1.1 Muestra 1 (Cucharas)

Fecha: 13-10-09

	RESULTADOS	
	Esperado	Obtenido
1	+	+
2	+	+
MODA	+	+

MODA GLOBAL	+
-------------	---

(+): Presencia ; (-): Ausencia

##### PRUEBA DE NORMALIDAD

NO APLICA POR SER CUALITATIVO, SE UTILIZA LA MODA. LAS MODAS SON IGUALES.

##### CONCLUSIÓN

EL ANALISTA REPORTA RESULTADOS REPETIBLES Y CONCORDANTES A LOS ESPERADOS.

##### 1.2 Muestra 2 (Tapons)

Fecha: 13-10-09

	RESULTADOS	
	Esperado	Obtenido
1	+	+
2	+	+
MODA	+	+

MODA GLOBAL	+
-------------	---

##### PRUEBA DE NORMALIDAD

NO APLICA POR SER CUALITATIVO, SE UTILIZA LA MODA. LAS MODAS SON IGUALES.

##### CONCLUSIÓN

EL ANALISTA REPORTA RESULTADOS REPETIBLES Y CONCORDANTES A LOS ESPERADOS.

##### 1.3 Muestra 3 (Vasos)

Fecha: 13-10-09

	RESULTADOS	
	Esperado	Obtenido
1	+	+
2	+	+
MODA	+	+

MODA GLOBAL	+
-------------	---

##### PRUEBA DE NORMALIDAD

NO APLICA POR SER CUALITATIVO, SE UTILIZA LA MODA. LAS MODAS SON IGUALES.

##### CONCLUSIÓN

EL ANALISTA REPORTA RESULTADOS REPETIBLES Y CONCORDANTES A LOS ESPERADOS.

POR LO TANTO, LOS RESULTADOS DE LOS ENSAYOS PRELIMINARES REPORTADOS POR EL ANALISTA SON SATISFACTORIOS.

**I. PRUEBAS ESTADÍSTICAS APLICADAS A LOS RESULTADOS**

**Método:**

ISO 18593:2004, Parte 8 y 9 excepto 8.1, 8.3.1, 8.3.3, 8.1, 8.2.3, RM- N° 461-2007/MINSA Parte 8.4, ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004.  
Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs. Guía técnica para el análisis microbiológico de superficies en contacto con alimentos y bebidas. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. Amendment 1:2004 Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data

**Determinación:** *Listeria monocytogenes*

**Producto:** Superficies regulares

**Analista 1:** Melody Vera

**ENSAYOS PRELIMINARES**

**1. RESULTADOS**

Se analizaron 2 muestras inoculadas con *Listeria monocytogenes* por duplicado, y se comparan los resultados esperados con los obtenidos experimentalmente.

**1.1 Superficie plana 1**

Fecha: 13-10-09

	RESULTADOS	
	Esperado	Obtenido
1	+	+
2	+	+
MODA	+	+

MODA GLOBAL	+
-------------	---

(+): Presencia ; (-): Ausencia

**2. PRUEBA DE NORMALIDAD**

NO APLICA POR SER CUALITATIVO,  
SE UTILIZA LA MODA. LAS MODAS SON IGUALES.

**CONCLUSIÓN**

EL ANALISTA REPOR TA RESULTADOS REPETIBLES Y CONCORDANTES A LOS ESPERADOS.

**1.2 Superficie plana 2**

Fecha: 13-10-09

	RESULTADOS	
	Esperado	Obtenido
1	+	+
2	+	+
MODA	+	+

MODA GLOBAL	+
-------------	---

**2. PRUEBA DE NORMALIDAD**

NO APLICA POR SER CUALITATIVO,  
SE UTILIZA LA MODA. LAS MODAS SON IGUALES.

**CONCLUSIÓN**

EL ANALISTA REPOR TA RESULTADOS REPETIBLES Y CONCORDANTES A LOS ESPERADOS.

POR LO TANTO, LOS RESULTADOS DE LOS ENSAYOS PRELIMINARES REPOR TADOS POR EL ANALISTA SON SATISFACTORIOS.

## Anexo 11. Pruebas estadísticas aplicadas a los resultados de la validación secundaria.



### IMPLEMENTACIÓN DE MÉTODO

#### I. PRUEBAS ESTADÍSTICAS APLICADAS A LOS RESULTADOS

Método a implementar: CERPER- CALLAO

Listeria monocytogenes

ISO ISO 18593:2004. Parte 8 y 9 excepto 8.1, 8.3.1, 8.3.3, 9.1, 9.2.3, RM- N° 461-2007/MINSA Parte 8.4 ,ISO 11290-1:1996 Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal methods for sampling techniques from surface using contact plates and swabs- Horizontal method for detection and enumeration of Listeria monocytogenes - Part 1: Detection method. ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004 Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data.

**Producto :** Superficies irregulares  
**Fecha :** 08/11/2013  
**Analista 1:** Diana Corro  
**Analista 2:** Janet Laura  
**Analista 3:** Mélody Vera  
**Analista 4:** Yanira All  
**Analista 5:** Karol Nishizaka  
**Analista 6:** Roger Sevilla  
**Analista 7:** Irma Cuba

#### 1. RESULTADOS

N° de Ensayos	Analista	Tipo de muestra	Listeria/U.M
1	1	Inoculada	Presencia
2		No inoculada	Ausencia
3		Inoculada	Presencia
4		Inoculada	Presencia
5		No inoculada	Ausencia
6	2	No inoculada	Ausencia
7		Inoculada	Presencia
8		No inoculada	Ausencia
9		Inoculada	Presencia
10		Inoculada	Presencia
11	3	Inoculada	Presencia
12		No inoculada	Ausencia
13		Inoculada	Presencia
14		Inoculada	Presencia
15		Inoculada	Presencia
16	4	Inoculada	Presencia
17		No inoculada	Ausencia
18		Inoculada	Presencia
19		Inoculada	Presencia
20		No inoculada	Ausencia
21	5	Inoculada	Presencia
22		Inoculada	Presencia
23		No inoculada	Ausencia
24		No inoculada	Ausencia
25		Inoculada	Presencia
26	6	Inoculada	Presencia
27		Inoculada	Presencia
28		No inoculada	Ausencia
29		Inoculada	Presencia
30		Inoculada	Presencia
31	7	Inoculada	Presencia
32		No inoculada	Ausencia
33		Inoculada	Presencia
34		No inoculada	Ausencia
35		Inoculada	Presencia

## IMPLEMENTACIÓN DE MÉTODO

### I. PRUEBAS ESTADÍSTICAS APLICADAS A LOS RESULTADOS

**Método a implementar:** CERPER- CALLAO

Listeria monocytogenes

ISO ISO 18593:2004. Parte 8 y 9 excepto 8.1, 8.3.1, 8.3.3, 9.1, 9.2.3, RM- N° 461-2007/MINSA Parte 8.4. ISO 11290-1:1996 Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal methods for sampling techniques from surface using contact plates and swabs- Horizontal method for detection and enumeration of Listeria monocytogenes - Part 1: Detection method. ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004 Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data.

**Producto :** Superficies irregulares  
**Fecha :** 08/11/2013  
**Analista 1:** Diana Corro  
**Analista 2:** Janet Laura  
**Analista 3:** Mélody Vera  
**Analista 4:** Yanira Ali  
**Analista 5:** Karol Nishizaka  
**Analista 6:** Roger Sevilla  
**Analista 7:** Irma Cuba

### 2. RESUMEN DE RESULTADOS EXPERIMENTALES DEL LABORATORIO

El análisis estadístico se realiza con los resultados obtenidos con los analistas tanto de las muestras inoculadas y muestras no inoculadas.

#### 2.1 ESQUEMA: TABLA DE CONTINGENCIA

Resultados del método	Resultados esperados		Total
	Positivo (Inoculado)	Negativo (No inoculado)	
Positivo (Detectado)	$N_{11}$	$N_{12}$	$N_{11} + N_{12}$
Negativo (No detectado)	$N_{21}$	$N_{22}$	$N_{21} + N_{22}$
Total	$N^+ = N_{11} + N_{21}$	$N^- = N_{12} + N_{22}$	$N$

#### 2.2. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Resultados del método	Resultados esperados		Total
	Positivo (Inoculado)	Negativo (No inoculado)	
Positivo (Detectado)	23	0	23
Negativo (No detectado)	0	12	12
Total	23	12	35

### 3. PARÁMETROS DE DESEMPEÑO A EVALUAR

#### 3.1 SENSIBILIDAD

Verdaderos positivos ( $N_{11}$ )	23
Positivos esperados ( $N^+$ )	23
SENSIBILIDAD (%)	Proporción de verdaderos positivos (PVP) = $N_{11} / N^+$
	100%

La sensibilidad será verificada con la proporción de verdaderos positivos (PVP) mediante la prueba binomial.

**Criterio de decisión:** El método es sensible cuando se verifique que PVP sea 100%.

**Prueba de hipótesis:**

$H_0$ : PVP = 1

$H_a$ : PVP < 1

Test and CI for One Proportion					
Test of PVP = 1.0000 vs PVP < 1.0000					
95%					
Upper Exact					
Sample	X	N	Sample p	Bound	P-Value
1	23	23	1.000000	*	1.000

**Conclusión:**

Como el p-value (1.000) es mayor que el nivel de significancia (0.05), entonces se concluye, al 95% de confianza, que el método es sensible.

## IMPLEMENTACIÓN DE MÉTODO

### I. PRUEBAS ESTADÍSTICAS APLICADAS A LOS RESULTADOS

**Método a implementar:** CERPER- CALLAO

Listeria monocytogenes

ISO ISO 18593:2004. Parte 8 y 9 excepto 8.1, 8.3.1, 8.3.3, 9.1, 9.2.3, RM- N° 461-2007/MINSA Parte 8.4. ISO 11290-1:1996 Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal methods for sampling techniques from surface using contact plates and swabs- Horizontal method for detection and enumeration of Listeria monocytogenes - Part 1: Detection method. ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004 Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data.

**Producto :** Superficies irregulares  
**Fecha :** 08/11/2013  
**Analista 1:** Diana Corro  
**Analista 2:** Janet Laura  
**Analista 3:** Mélody Vera  
**Analista 4:** Yanira Ali  
**Analista 5:** Karol Nishizaka  
**Analista 6:** Roger Sevilla  
**Analista 7:** Irma Cuba

#### 3.2 ESPECIFICIDAD

	Verdaderos negativos ( $N_{22}$ )	12
	Negativos esperados ( $N_{-}$ )	12
<b>ESPECIFICIDAD (%)</b>	Proporción de verdaderos negativos (PVN) = $N_{22} / N_{-}$	100%

La especificidad será verificada con la proporción de verdaderos negativos (PVN) mediante la prueba binomial.  
**Criterio de decisión:** El método es específico cuando se verifique que PVN sea 100%.

**Prueba de hipótesis:**  
 $H_0$ : PVN = 1  
 $H_a$ : PVN < 1

Test and CI for One Proportion					
Test of $p = 1.0000$ vs $p < 1.0000$					
95%					
Upper Exact					
Sample	X	N	Sample p	Upper Bound	P-Value
1	12	12	1.000000	*	1.000

**Conclusión:**

Como el p-value (1.000) es mayor que el nivel de significancia (0.05), entonces se concluye, con un nivel de confianza del 95%, que el método es específico.

#### 3.3 EXACTITUD RELATIVA

El método es exacto cuando es veraz, es decir, demuestra un alto grado de concordancia con los resultados esperados; y cuando es preciso, es decir, demuestra que los resultados esperados para las muestras inoculadas coinciden entre sí, en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia, y lo mismo ocurre con los resultados esperados de las muestras no inoculadas.

	Resultados concordantes a los valores esperados ( $N_{11} + N_{22}$ )	35
	Total de ensayos (N)	35
<b>EXACTITUD (%)</b>	Exactitud relativa (ER) = $(N_{11} + N_{22}) / N$	100%

La exactitud relativa será verificada con la proporción de resultados concordantes a los esperados mediante la prueba binomial.

**Criterio de decisión:** El método es exacto cuando se verifique que ER sea 100%.

**Prueba de hipótesis:**  
 $H_0$ : ER = 1  
 $H_a$ : ER < 1

Test and CI for One Proportion					
Test of ER = 1.0000 vs ER < 1.0000					
95%					
Upper Exact					
Sample	X	N	Sample p	Upper Bound	P-Value
1	35	35	1.000000	*	1.000

**Conclusión:**

Como el p-value (1.000) es mayor que el nivel de significancia (0.05), entonces se concluye, con un nivel de confianza del 95%, que los resultados del método son exactos (veraces y precisos).

## IMPLEMENTACIÓN DE MÉTODO

### I. PRUEBAS ESTADÍSTICAS APLICADAS A LOS RESULTADOS

Método a implementar: CERPER- CALLAO

Listeria monocytogenes

ISO ISO 18593:2004. Parte 8 y 9 excepto 8.1, 8.3.1, 8.3.3, 9.1, 9.2.3, RM- N° 461-2007/MINSA Parte 8.4 .ISO 11290-1:1996 Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal methods for sampling techniques from surface using contact plates and swabs- Horizontal method for detection and enumeration of Listeria monocytogenes - Part 1: Detection method. ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004 Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data.

Producto : Superficies regulares  
 Fecha : 11/11/2013  
 Analista 1: Diana Corro  
 Analista 2: Janet Laura  
 Analista 3: Méloody Vera  
 Analista 4: Yanira Ali  
 Analista 5: Karol Nishizaka  
 Analista 6: Roger Sevilla  
 Analista 7: Irma Cuba

### 1. RESULTADOS

N° de Ensayos	Analista	Tipo de muestra	Listeria/cm <sup>2</sup>
1	1	Inoculada	Presencia
2		No inoculada	Ausencia
3		Inoculada	Presencia
4		Inoculada	Presencia
5		No inoculada	Ausencia
6	2	No inoculada	Ausencia
7		Inoculada	Presencia
8		No inoculada	Ausencia
9		Inoculada	Presencia
10	3	Inoculada	Presencia
11		Inoculada	Presencia
12		No inoculada	Ausencia
13		Inoculada	Presencia
14		No inoculada	Ausencia
15	4	Inoculada	Presencia
16		Inoculada	Presencia
17		No inoculada	Ausencia
18		Inoculada	Presencia
19	5	Inoculada	Presencia
20		No inoculada	Ausencia
21		No inoculada	Ausencia
22		Inoculada	Presencia
23		Inoculada	Presencia
24		No inoculada	Ausencia
25	6	Inoculada	Presencia
26		Inoculada	Presencia
27		Inoculada	Presencia
28		No inoculada	Ausencia
29	No inoculada	Ausencia	
30	7	Inoculada	Presencia
31		Inoculada	Presencia
32		No inoculada	Ausencia
33		Inoculada	Presencia
34		No inoculada	Ausencia
35	7	Inoculada	Presencia

## IMPLEMENTACIÓN DE MÉTODO

### I. PRUEBAS ESTADÍSTICAS APLICADAS A LOS RESULTADOS

Método a implementar: CERPER- CALLAO

Listeria monocytogenes

ISO ISO 18593:2004. Parte 8 y 9 excepto 8.1, 8.3.1, 8.3.3, 9.1, 9.2.3, RM- N° 461-2007/MINSA Parte 8.4. ISO 11290-1:1996 Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal methods for sampling techniques from surface using contact plates and swabs- Horizontal method for detection and enumeration of Listeria monocytogenes - Part 1: Detection method. ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004 Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data.

**Producto :** Superficies regulares  
**Fecha :** 11/11/2013  
**Analista 1:** Diana Corro  
**Analista 2:** Janet Laura  
**Analista 3:** Mélody Vera  
**Analista 4:** Yanira Ali  
**Analista 5:** Karol Nishizaka  
**Analista 6:** Roger Sevilla  
**Analista 7:** Irma Cuba

### 2. RESUMEN DE RESULTADOS EXPERIMENTALES DEL LABORATORIO

El análisis estadístico se realiza con los resultados obtenidos con los analistas tanto de las muestras inoculadas y muestras no inoculadas.

#### 2.1 ESQUEMA: TABLA DE CONTINGENCIA

Resultados del método	Resultados esperados		Total
	Positivo (Inoculado)	Negativo (No inoculado)	
Positivo ( Detectado )	$N_{11}$	$N_{12}$	$N_{11}+N_{12}$
Negativo ( No detectado )	$N_{21}$	$N_{22}$	$N_{21}+N_{22}$
Total	$N+ = N_{11}+N_{21}$	$N- = N_{12}+ N_{22}$	$N$

#### 2.2. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Resultados del método	Resultados esperados		Total
	Positivo (Inoculado)	Negativo (No inoculado)	
Positivo ( Detectado )	21	0	21
Negativo ( No detectado )	0	14	14
Total	21	14	35

### 3. PARÁMETROS DE DESEMPEÑO A EVALUAR

#### 3.1 SENSIBILIDAD

Verdaderos positivos ( $N_{11}$ )	21
Positivos esperados ( $N+$ )	21
<b>SENSIBILIDAD (%)</b> Proporción de verdaderos positivos (PVP) = $N_{11} / N+$	100%

La sensibilidad será verificada con la proporción de verdaderos positivos (PVP) mediante la prueba binomial.  
 Criterio de decisión: El método es sensible cuando se verifique que PVP sea 100%.

Prueba de hipótesis:

$H_0$ : PVP = 1

$H_a$ : PVP < 1

Test and CI for One Proportion					
Test of PVP = 1.0000 vs PVP < 1.0000					
95%					
Upper Exact					
Sample	X	N	Sample p	Bound	P-Value
1	21	21	1.000000	*	1.000

Conclusión:

Como el p-value (1.000) es mayor que el nivel de significancia (0.05), entonces se concluye, al 95% de confianza, que el método es sensible.

## IMPLEMENTACIÓN DE MÉTODO

### I. PRUEBAS ESTADÍSTICAS APLICADAS A LOS RESULTADOS

**Método a implementar:** CERPER- CALLAO

Listeria monocytogenes

ISO ISO 18593:2004. Parte 8 y 9 excepto 8.1, 8.3.1, 8.3.3, 9.1, 9.2.3, RM- N° 461-2007/MINSA Parte 8.4 .ISO 11290-1:1996 Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal methods for sampling techniques from surface using contact plates and swabs- Horizontal method for detection and enumeration of Listeria monocytogenes - Part 1: Detection method. ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004 Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data.

**Producto :** Superficies regulares  
**Fecha :** 11/11/2013  
**Analista 1:** Diana Corro  
**Analista 2:** Janet Laura  
**Analista 3:** Mélody Vera  
**Analista 4:** Yanira Ali  
**Analista 5:** Karol Nishizaka  
**Analista 6:** Roger Sevilla  
**Analista 7:** Irma Cuba

### 3.2 ESPECIFICIDAD

	Verdaderos negativos ( $N_{22}$ )	14
	Negativos esperados (N-)	14
ESPECIFICIDAD (%)	Proporción de verdaderos negativos (PVN) = $N_{22} / N-$	100%

La especificidad será verificada con la proporción de verdaderos negativos (PVN) mediante la prueba binomial.  
**Criterio de decisión:** El método es específico cuando se verifique que PVN sea 100%.

**Prueba de hipótesis:**

Ho: PVN = 1

Ha: PVN < 1

Test and CI for One Proportion					
Test of PVN = 1.0000 vs PVN < 1.0000					
95%					
Upper Exact					
Sample	X	N	Sample p	Bound	P-Value
1	14	14	1.000000	*	1.000

**Conclusión:**

Como el p-value (1.000) es mayor que el nivel de significancia (0.05), entonces se concluye, con un nivel de confianza del 95%, que el método es específico.

### 3.3 EXACTITUD RELATIVA

El método es exacto cuando es veraz, es decir, demuestra un alto grado de concordancia con los resultados esperados; y cuando es preciso, es decir, demuestra que los resultados esperados para las muestras inoculadas coinciden entre sí, en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia, y lo mismo ocurre con los resultados esperados de las muestras no inoculadas.

	Resultados concordantes a los valores esperados ( $N_{11} + N_{22}$ )	35
	Total de ensayos (N)	35
EXACTITUD (%)	Exactitud relativa (ER) = $(N_{11} + N_{22}) / N$	100%

La exactitud relativa será verificada con la proporción de resultados concordantes a los esperados mediante la prueba binomial.

**Criterio de decisión:** El método es exacto cuando se verifique que ER sea 100%.

**Prueba de hipótesis:**

Ho: ER = 1

Ha: ER < 1

Test and CI for One Proportion					
Test of ER = 1.0000 vs ER < 1.0000					
95%					
Upper Exact					
Sample	X	N	Sample p	Bound	P-Value
1	35	35	1.000000	*	1.000

**Conclusión:**

Como el p-value (1.000) es mayor que el nivel de significancia (0.05), entonces se concluye, con un nivel de confianza del 95%, que los resultados del método son exactos (veraces y precisos).

Anexo 12. Formato de los resultados del método ISO 11290-1:1996 /AMENDMENT 1:2004.



OIE 16334  
Nº DE LAB. 1027

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA	HISOPADOS	Listeria monocytogenes
------------------------------	-----------	------------------------

FECHA DE INICIO : 13.10.22 HORA: 13:00  
FECHA DE TERMINO: 13.11.03

Medio	Lote	Fecha de Ingreso	Cultivos	n1		n2		n3		n4	
				24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
A	Caldio Fraser	U. 623	FL 13.10.22	+	-	-	-	-	-	-	-
B	Caldio Fraser	U. 623	FL 13.10.22	-	-	-	-	-	-	-	-
A	Agar ALCA	U. 615	FL 13.10.22	+	-	-	-	-	-	-	-
B	Agar PALCAM	U. 616	FL 13.10.22	+	-	-	-	-	-	-	-
A	Agar ALCA	U. 615	FL 13.10.22	+	-	-	-	-	-	-	-
B	Agar PALCAM	U. 616	FL 13.10.22	+	-	-	-	-	-	-	-
A	TSBYE	U. 658	FL 13.10.22	+	-	-	-	-	-	-	-
B	TSBYE	U. 658	FL 13.10.22	+	-	-	-	-	-	-	-
A	Catexa (+)	U. 724	FL 13.10.26	+	-	-	-	-	-	-	-
B	Gram (+)	U. 724	FL 13.10.26	+	-	-	-	-	-	-	-
A	Agar movilidad	U. 706	FL 13.10.28	+	-	-	-	-	-	-	-
B	CAMP + (Agar sangre)	U. 706	FL 13.10.28	+	-	-	-	-	-	-	-
A	TSBYE	U. 706	FL 13.10.28	+	-	-	-	-	-	-	-
B	Rheminos (+)	U. 725	FL 13.11.01	+	-	-	-	-	-	-	-
A	Xyloza (+)	U. 724	FL 13.11.01	+	-	-	-	-	-	-	-
B	Catexa (+)	U. 724	FL 13.10.28	+	-	-	-	-	-	-	-
A	Gram (+)	U. 724	FL 13.10.28	+	-	-	-	-	-	-	-
B	Agar movilidad	U. 706	FL 13.11.02	+	-	-	-	-	-	-	-
A	CAMP + (Agar sangre)	U. 706	FL 13.10.28	+	-	-	-	-	-	-	-
B	TSBYE	U. 706	FL 13.10.28	+	-	-	-	-	-	-	-
A	Rheminos (+)	U. 725	FL 13.11.02	+	-	-	-	-	-	-	-
B	Xyloza (+)	U. 724	FL 13.11.02	+	-	-	-	-	-	-	-

R= RESULTADO S: sospechoso T: Colonia típica U.M: Unidad muestrada A.M: Área muestrada

Capas control: Alantamiento y bioquímico: Prueba CAMP: Control: ML 03 Listeria monocytogenes ATCC 19111 ML 33 Staphylococcus aureus ATCC 25923 ML 04 Rhodococcus equi ATCC 6939 ML 14 Listeria innocua ATCC 33090 ML 15 Listeria ivanovi subsp. novoi ATCC 19119

Ensayo de Listeria monocytogenes:  
1.- Para las pruebas de confirmación, tomar de cada placa de medio selectivo cinco colonias presuntivas de Listeria spp.  
2.- Si en una placa hubiera menos de cinco colonias típicas o sospechosas, tome para la confirmación todas las colonias típicas o sospechosas.  
3.- Reportar de acuerdo a ISO 18593 para los ensayos de hisopados

EQUIPOS:  
INCUBADORAS  
25 ± 1°C [2510] [ ] [ ]  
30 ± 1°C [1201] [1201] [ ]  
37 ± 1°C [1210] [1210] [ ]

Listeria monocytogenes ISO 18593:2004, Parte 8 y 9 ejemplo B.1, B.3.1, B.3.3, B.1, B.2.3, R34- Nº 481-2007/MINSA Parte 8.4 ISO 11290-1:1996 microbiology of food and animal feeding stuffs - Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal methods for sampling techniques from surface using contact plates and swabs- Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes - Part 1: Detection method. ISO 11290-1:1996/Amend 1:2004 Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data.

OBSERVACIONES:

[Firma] ANEXISTA [Firma] JEFE DE SECCION / SUPERVISOR 13.11.04 FECHA DE EMISION

EVALUACIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD Y SELECTIVIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

F. preparación :

Medio / N° Lote / Fecha de Lectura	TEMPERATURA °C	METODO DE CONTROL	TIEMPO	CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO				
				Función	Copa Control	Reacción característica del microorganismo	Criterio	
							Conforme	No conforme
Cuido Fraser, N° Lote: 587 FL: 13.10.25 Equipamiento pasado	30 ± 1°C	Semi-cuantitativo	24 ± 2h	Productividad	ML 03	M.O.: >10 colonias en agar ALGA, colonias verde - azules rodeadas de un halo opaco.	/	
Agar ALGA, N° Lote: 615 Agar PALCAM, N° Lote: 616 FL: 13.10.25	37 ± 1		24-48h			M.O.: >10 colonias en agar PALCAM, colonias verde grisáceo o verde olivá con una depresión central rodeadas de un halo negro.	/	
Agar TSA, N° Lote: 623 FL: 13.10.24			24 ± 3 h	Selectividad	ML 27	M.N.O.: Inhibición total en TSA	/	
Cuido Fraser, N° Lote: 587 FL: 13.10.25 Equipamiento estandarizado	37 ± 1	Semi-cuantitativo	48 ± 2h	Productividad	ML 03	M.O.: >10 colonias en agar ALGA, colonias verde - azules rodeadas de un halo opaco.	/	
Agar ALGA, N° Lote: 615 Agar PALCAM, N° Lote: 616 FL: 13.10.25			24-48h			M.O.: >10 colonias en agar PALCAM, colonias verde grisáceo o verde olivá con una depresión central rodeadas de un halo negro.	/	
Agar TSA, N° Lote: 623 FL: 13.10.26			24 ± 3 h	Selectividad	ML 27	M.N.O.: Inhibición total en TSA	/	
Agar ALGA, Observant and Agost N° Lote: 615 FL: 13.10.25	37 ± 1°C	Cuantitativo	24-48h	Productividad	ML 03	$N_p = 110$ $P_{\text{estimada}} \geq 0.5$ $N_p = 145$ $P_{\text{estimada}} = 0.76$	/	
TSA N° Lote: 623				M.O.: Colonias verde - azules rodeadas de un halo opaco	/			
		Cualitativo		Especificidad ML 14 Selectividad ML 27	M.O.: colonias verde - azules sin halo opaco M.N.O.: Total Inhibición	/		
Agar PALCAM, N° Lote: 616 FL: 13.10.25	37 ± 1°C	Cuantitativo	24-48h	Productividad	ML 03	$N_p = 105$ $P_{\text{estimada}} \geq 0.5$ $N_p = 135$ $P_{\text{estimada}} = 0.98$	/	
		Cualitativo		Selectividad	ML 27	M.N.O.: Total Inhibición	/	
Agar TSAYE, N° Lote: 658 FL: 13.10.26	37 ± 1	Cualitativo	18-24h	Productividad	ML 03	M.O.: buen crecimiento (puntaje: 2)	/	
Cuido TSBYE, N° Lote: 705 FL: 13.10.26	25 ± 1°C	Cualitativo	8-24h	Productividad	ML 03	M.O.: buen crecimiento (puntaje: 2)	/	

**Anexo 13. Instructivo de los procesos operativos no especificados en el método ISO 11290-1:1996/AMENDMENT 1:2004.**

<b>MANUAL DE INSTRUCCIONES LABORATORIO DE ENSAYO</b>		
Código 60XX-I	Versión 01/2013	Página 1 de 1

**DETECCIÓN DE *Listeria monocytogenes* MÉTODO ISO (X)**

**1. OBJETIVO.**

*Complementar el desarrollo del ensayo para la detección de *Listeria monocytogenes* Método ISO (X)*

**2. ALCANCE.**

*Esta instrucción es aplicable a todos los productos indicados en la matriz de aseguramiento de la calidad para el presente método.*

**3. RESPONSABILIDAD**

*3.1 El jefe de sección y/o supervisor es responsable de la implementación y seguimiento de esta instrucción.*

*3.2 El analista asignado, es responsable de su aplicación.*

**4. TERMINOS Y DEFINICIONES**

*No aplica.*

**5. DESARROLLO**

- El método Detection method. ISO 11290-1:1996 indica en la sección 9.3.2 Incubar el medio caldo fraser repotenciado por 48h ± 2h a 35 ó 37°C.*
- El laboratorio incubará el caldo fraser repotenciado a una temperatura de 37 ± 1°C.*
- El método Detection method. ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004 en la sección 5.4.2 indica que la elección del segundo medio de cultivo selectivo se deja a discreción del laboratorio.*
- El laboratorio usará como segundo medio selectivo agar PALCAM y se incubará a 37 ± 1°C en aerobiosis durante 48h± 3h.*
- El laboratorio incubará el Agar ALOA por 48h± 3h.*
- El método Detection method. ISO 11290-1:1996 indica en la sección: 9.5.1.2 incubar las placas de TSAYE a una temperatura de 35°C o 37°C..."*
- El laboratorio incubará las placas de TSAYE a 37 ± 1°C.*
- El método Detection method. ISO 11290-1:1996 indica en la Nota 8; la prueba de iluminación de Henry puede ser realizada, si es necesario (...).*
- El laboratorio no llevara a cabo esta prueba.*
- Para la realización de la tinción de GRAM el laboratorio usará un equipo de tinción GRAM comercial.*

**CERTIFICACIONES DEL PERU S.A.**

Elaborado:	Revisado: D. Sánchez	Aprobado: G. Reyes
Fecha:	Fecha: 2013-	Fecha: 2013-
<i>Firma en original</i>	<i>Firma en original</i>	<i>Firma en original</i>

<b>MANUAL DE INSTRUCCIONES LABORATORIO DE ENSAYO</b>		
Código 60XX-I	Versión 01/2012	Página 2 de 2

- El método *Detection method. ISO 11290-1:1996* indica en ítem 9.5.4 que la prueba de motilidad no es necesaria en todos los casos ...
- El laboratorio realizará la Prueba alternativa de motilidad.
- El método *Detection method. ISO 11290-1:1996* indica en ítem 9.6.2 que los azúcares xilosa y ramnosa se incubarán a 35°C o 37°C ...
- El laboratorio incubará los azúcares xilosa y ramnosa a 37 ± 1°C.
- El método *Detection method. ISO 11290-1:1996* indica en el ítem: 9.6.3 que las placas de agar sangre se incuban a 35°C o 37°C por 18h a 24h.
- El laboratorio incubará las placas de agar sangre a 37 ± 1°C 18h a 24h.

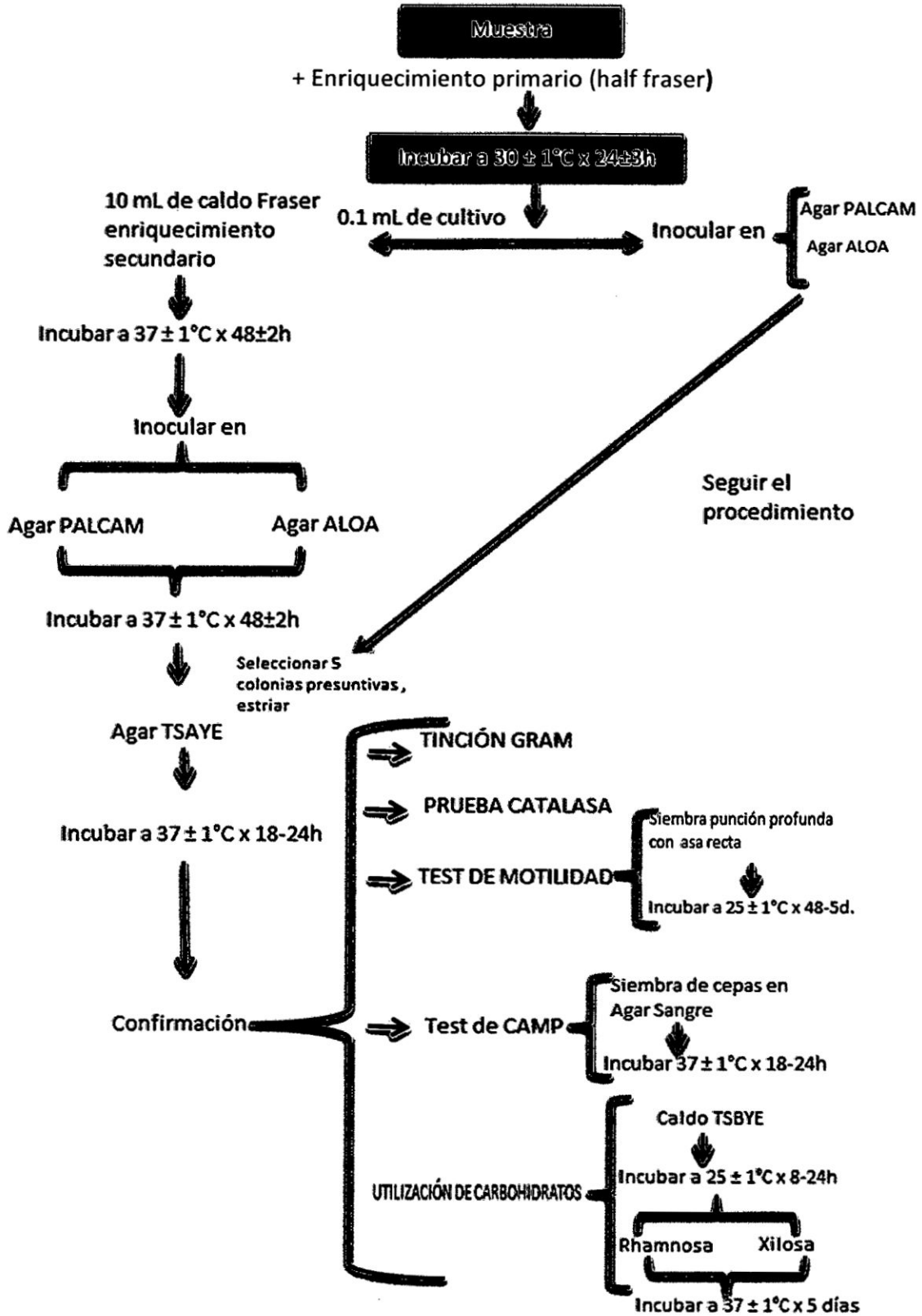
**6. REGISTROS**

- Hoja de ensayo HE-MI-H
- Hoja de ensayo HE-MI-LM

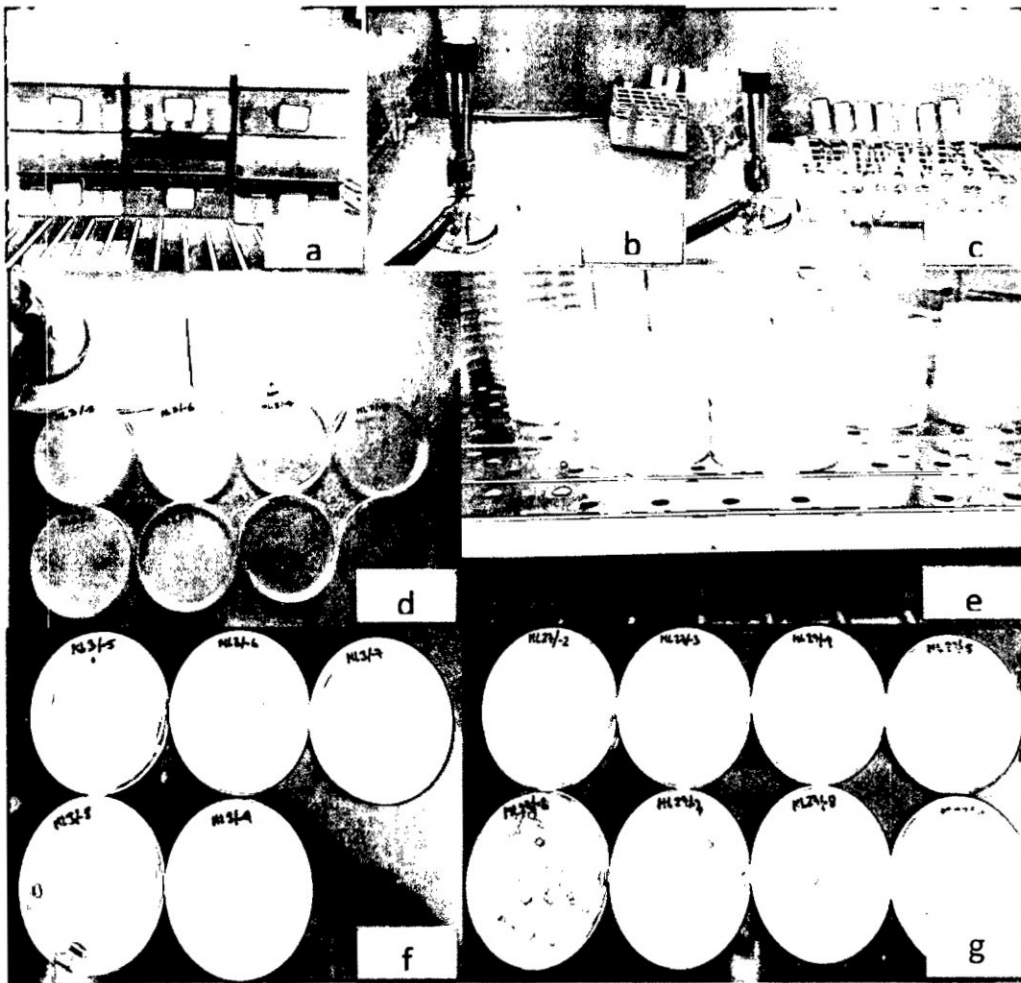
**8 REFERENCIA**

- *ISO 11290-1:1996 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes.*
- *ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004 Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data.*

**Anexo 14. Protocolo del proceso de detección de *Listeria monocytogenes* ISO 11290-1:1996/AMENDMENT 1:2004**

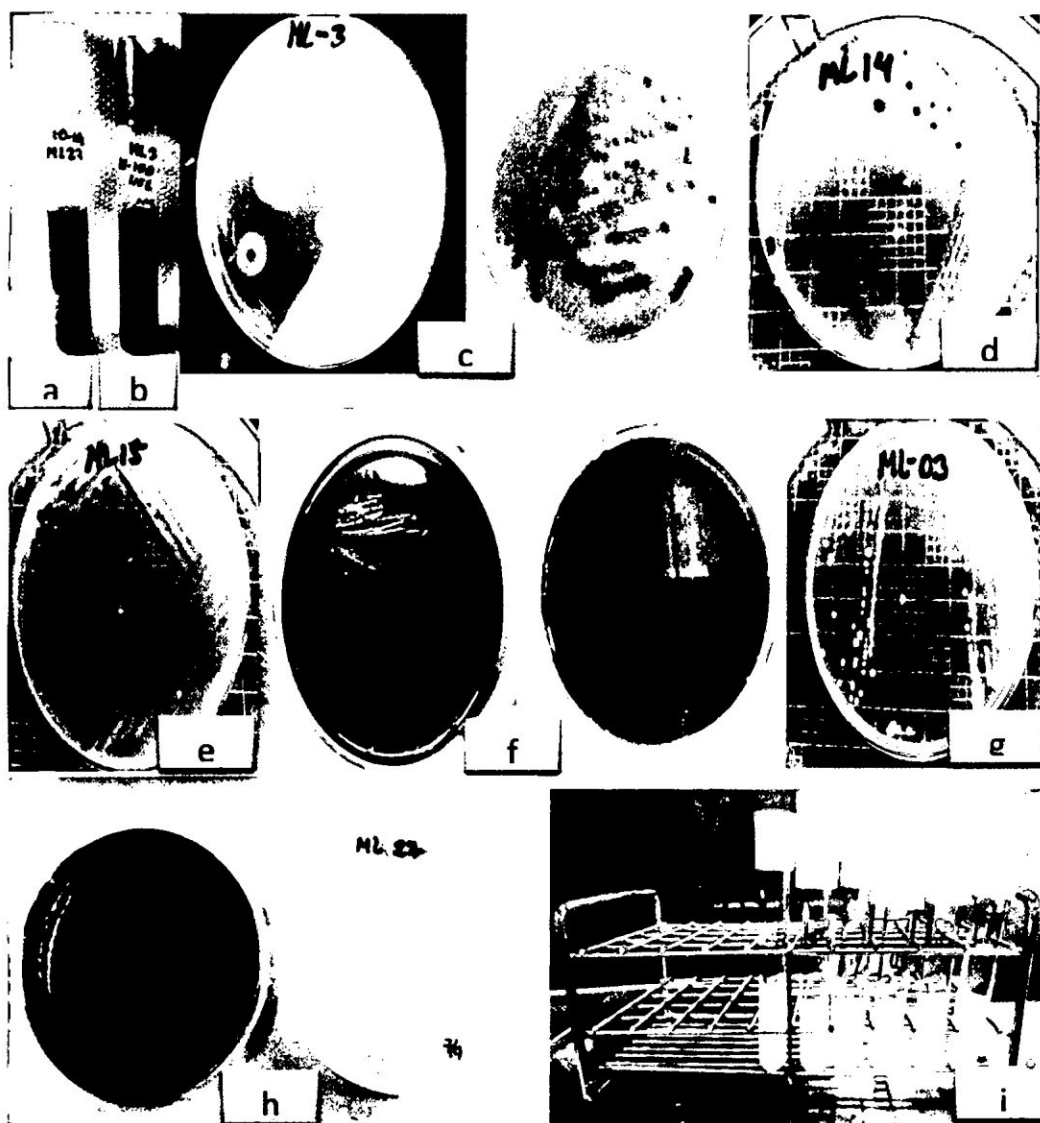


**Anexo 15.** Procedimiento de la determinación de inóculo del microorganismo objetivo (*Listeria monocytogenes*) y microorganismo no objetivo (*Escherichia coli*).



- a) Cepas de trabajo rutinario en refrigeración, b) cepa de trabajo en microvial, c) diluciones sucesivas a partir de un cultivo de 24h, d) siembra del inóculo por duplicado, e) incubación de las placas inoculas, f) recuento del microorganismo no objetivo, g) recuento del microorganismo objetivo.

**Anexo 16.** Crecimiento del microorganismo objetivo (*Listeria monocytogenes*) y no objetivo (*Escherichia coli*) en medios de cultivo selectivo y no selectivo.



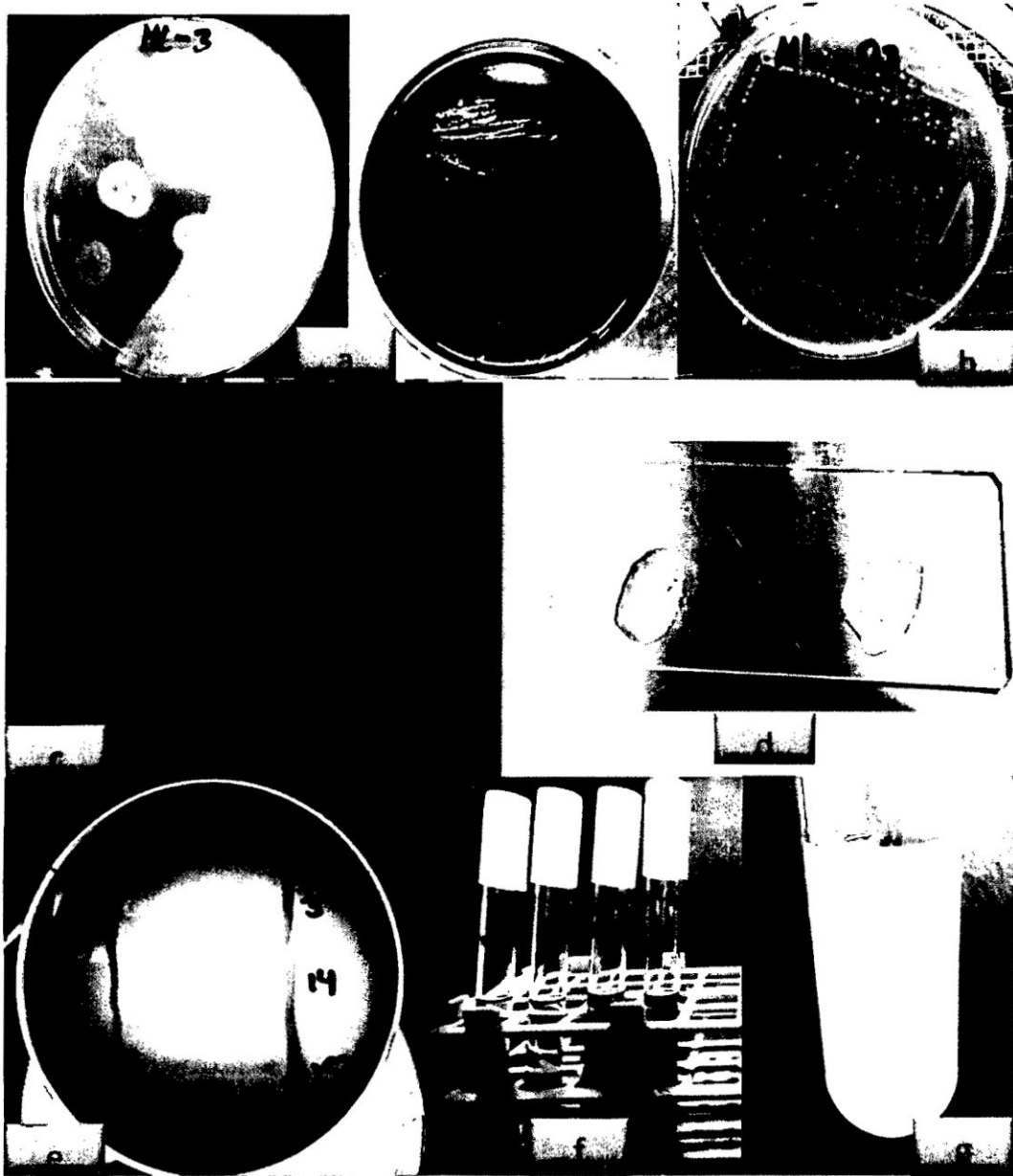
a) Caldo Fraser con cepa *E. coli*, b) caldo Fraser con cepa de *L. monocytogenes*, c) Agar ALOA con cepa *L. monocytogenes*, d) Agar ALOA con cepa *L. innocua*, e) Agar ALOA con cepa *L. ivanovii*, f) Agar PALCAM con cepa *L. monocytogenes*, g) Agar TSAYE con cepa *L. monocytogenes*, h) Agar ALOA Y PALCAM con cepa *E. coli*, h) Caldo TSBYE con cepa *L. monocytogenes*.

**Anexo 17. Inoculación del microorganismo objetivo (*Listeria monocytogenes*) y no objetivo (*Escherichia coli*) en superficies inertes irregulares y regulares.**



a) Inoculación de superficies irregulares (cucharas, tapers, vasos) con 100mL de microorganismo objetivo de 10 – 100 UFC y microorganismo no objetivo >1000 UFC b) frasco estéril con los 100 mL del inóculo recogido de cada matriz, c) esponja estéril, d) cuadrante estéril, e) hidratación de la esponja con 10 mL de diluyente, f) recojo de la muestra, g) corte de la zona donde se tobo contacto con la mano, h) incorporación de 90mL de caldo fraser enriquecimiento primario.

**Anexo 18.** Bioquímica de *Listeria monocytogenes* según el método ISO 11290-1:1996/AMENDMENT 1:2004.



- a) Crecimiento de *Listeria monocytogenes* en agar ALOA y agar PALCAM, b) *Listeria monocytogenes* en agar TSAYE, c) Tinción GRAM de *L. monocytogenes*, d) Prueba de catalasa, e) prueba de CAMP, f) fermentación de azúcares, g) prueba de motilidad.

**MATRIZ DE CONSISTENCIA**

Validación del método: "ISO 11290 - 1:1996/Amd 1:2004 Microbiología de los alimentos y pienso método horizontal para la detección y enumeración de *Listeria monocytogenes*", en hisopados de superficie inerte. Certificaciones del Perú, S.A. (CERPER), Lima 2013 - 2014.

PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
<p>¿Bajo las condiciones de trabajo en Certificaciones del Perú, S.A en qué medida la validación secundaria del método ISO 11290 - 1:1996/Amd 1:2004 Microbiología de los alimentos y pienso método horizontal para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i>, en hisopados de superficie inerte, bajo las condiciones de trabajo en Certificaciones del Perú, S.A (CERPER).</p> <p><b>2.- ESPECÍFICOS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Determinar el inóculo para el control de calidad del medio de cultivo y para la inoculación de la muestra.</li> <li>• Evaluar la productividad y selectividad de los medios de cultivo utilizados para <i>Listeria monocytogenes</i>.</li> <li>• Asegurar la calidad de los resultados mediante la determinación del monitoreo de las condiciones microbiológicas del ambiente de trabajo, verificación de la calibración de los equipos.</li> <li>• Determinar la especificidad, sensibilidad y la exactitud relativa del método.</li> <li>• Elaborar un instructivo que detalle los procesos operativos no especificados en el método con fines de acreditación de la prueba ante INDECOPI.</li> </ul>	<p><b>1.- GENERAL</b></p> <p>Realizar la validación secundaria del método "ISO 11290 - 1:1996/Amd 1:2004 Microbiología de los alimentos y pienso método horizontal para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i>", en hisopados de superficie inerte, bajo las condiciones de trabajo en Certificaciones del Perú, S.A (CERPER).</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antecedentes</li> <li>• Validación primaria</li> <li>• Validación secundaria</li> <li>• Parámetros analíticos para una validación de una técnica o método, especificidad, exactitud, precisión, selectividad</li> <li>• ISO</li> <li>• Sistema de gestión de la calidad</li> <li>• Control de calidad</li> <li>• Calidad en la industria alimentaria, características de la calidad en la industria alimentaria</li> <li>• Contaminación microbiana en la industria alimentaria</li> <li>• Análisis microbiológico de superficies.</li> <li>• <i>Listeria monocytogenes</i> origen, descripción.</li> <li>• Taxonomía</li> <li>• Listeriosis</li> <li>• Detección microbiológica de <i>Listeria monocytogenes</i> en la industria alimentaria</li> <li>• Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> en superficie en inertes</li> </ul>	<p>Bajo las condiciones de trabajo en Certificaciones del Perú, S.A (CERPER) la validación secundaria del método ISO 11290 - 1:1996/Amd 1:2004 Microbiología de los alimentos y pienso método horizontal para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i>, en hisopados de superficie inerte; tiene correspondencia a la validación primaria.</p>	<p><b>VARIABLES PRINCIPALES:</b></p> <p>Validación secundaria <i>Listeria monocytogenes</i>.</p> <p><b>INDICADORES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensibilidad</li> <li>- Especificidad</li> <li>- Exactitud</li> <li>- Precisión</li> </ul>	<p>Tipo de investigación Básica</p> <p>Nivel de Investigación Descriptivo</p> <p>Diseño Transversal Descriptivo</p> <p>Procesamiento de datos: Uso de Minitab 7</p> <p>Prueba binomial</p>