

Experiencia de Agrolab Ibérica, S.L.U en el uso de MR Microbiológicos de IELAB

David Rull – Lab Leader

19 de Mayo 2015



AGROLAB GROUP

Your labs. Your service.



Cifras y hechos alrededor de AGROLAB

- 4 áreas: ofrecemos analítica agraria, medioambiental, de agua y productos alimenticios.
- 1200 empleados: estado 2014
- 20 filiales europeas: estamos presentes en toda Europa.
- Fundación 1986: AGROLAB se inicia con solo 3 empleados.
- Sede central del AGROLAB GROUP: Bruckberg, Baja Baviera
- Paul Wimmer Socio Director Ejecutivo de AGROLAB GROUP
- 100.000: cantidad de resultados determinados diariamente (parámetros individuales)
- Matraz de Erlenmeyer y ordenador portátil: ¡Nuestro logotipo!



AGROLAB GROUP

Your labs. Your service.

Agrolab Ibérica, S.L.U Centro de Tarragona

- Laboratorio Acreditado ISO 17025 desde 2001
- Amplio espectro de análisis en diferentes matrices y productos





AGROLAB GROUP

Your labs. Your service.

norma
española

UNE-EN ISO 7218

Febrero 2008

TÍTULO	Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal Requisitos generales y guía para el examen microbiológico (ISO 7218:2007) <i>Microbiology of food and animal feeding stuffs. General requirements and guidance for microbiological examination. ISO 7218:2007.</i> <i>Microbiología de alimentos. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico. ISO 7218:2007.</i>
CORRESPONDENCIA	Esta norma es la versión oficial, en español, de la Norma Europea EN ISO 7218:2007, que a su vez adapta la Norma Internacional ISO 7218:2007.
OBSERVACIONES	
ANTECEDENTES	Esta norma ha sido elaborada por el comité técnico AEN/CTN 34 Producción Alimentaria según la norma de desarrollo UNE-EN ISO 7218:2007.

Basarse siempre en la edición
Diciembre 2007 (15/01/2008)
© AENOR 2008
Reproducción prohibida.

LA OBSERVACIÓN A ESTE DOCUMENTO NO SE DEBEMOS A
AENOR Asociación Española de
Normalización y Certificación
C/Alfonso 12 61 491 00 00
Teléfono 91 380 41 02
Fax 91 380 41 02

14 Páginas
Grupo 42

AENOR AUTORIZA EL USO DE ESTE DOCUMENTO A LABORATORIS VIDAL SL

AENOR

- 63 -

ISO 7218:2007

14.3 Validación de los métodos internos

La validación de los métodos internos se está investigando en el Subcomité ISO/TC 34/SC 9.

15 VALORACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS/CONTROL DE CALIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DEL MÉTODO

15.1 Control interno de la calidad

15.1.1 El control interno de la calidad consiste en todos los procedimientos realizados por un laboratorio para la evaluación continua de su trabajo. El objetivo fundamental es asegurar la consistencia de los resultados de los ensayos y su conformidad en base a criterios bien definidos.

15.1.2 Es necesario mantener un programa de comprobaciones periódicas para demostrar que la variabilidad entre análisis, entre equipos e entre materiales está controlada. Se deben abarcar todos los análisis incluidos dentro del ámbito de actividades del laboratorio.

El programa puede incluir:

- el uso de muestras a las que se ha añadido deliberadamente unos niveles de contaminación variables, incluyendo tanto la forma líquida como la que está sujeta a investigación;
- el uso de muestras controladas artificialmente o de forma natural procedentes de diversas matrices;
- el uso de materiales de referencia (incluyendo materiales incluidos en esquemas de repetición analítica);
- repetición de los análisis;
- repetición de la evaluación de los resultados de los análisis.

La periodicidad entre dichas comprobaciones está relacionada con la naturaleza de los análisis realizados por el laboratorio y con la frecuencia con la que se realizan los análisis.

Se recomienda que, en la medida de lo posible, los análisis incorporen controles con los que monitorizar su correcto funcionamiento.

15.1.3 En casos especiales, un laboratorio puede realizar un análisis determinado sólo de forma muy ocasional. En tales casos, es posible que un programa de control interno de la calidad pueda no resultar adecuado y, por el contrario, se más razonable un control realizado en paralelo a los análisis que demuestre su correcto funcionamiento.

15.2 Copias de referencia

Véase la Norma ISO 11133 sobre el mantenimiento de las copias de referencia.

15.3 Valoración externa de la calidad (ejercicio interlaboratorio)

Los laboratorios deberían participar periódicamente en ejercicios interlaboratorios relacionados con su ámbito de actividades. Deberían priorizarse los ejercicios interlaboratorios sobre los matrices adecuadas.

Los laboratorios deberían utilizar los ejercicios interlaboratorios, no solamente para evaluar los posibles fallos del laboratorio sino también para comprender la visión de su sistema de calidad global.

AENOR AUTORIZA EL USO DE ESTE DOCUMENTO A LABORATORIS VIDAL SL

15.2 Copias de referencia

Véase la Norma ISO 11133 sobre el mantenimiento de las copias de referencia.



AGROLAB GROUP

Your labs. Your service.

norma española

UNE-EN ISO 11133

Septiembre 2014

TÍTULO	<p>Microbiología de los alimentos para consumo humano, alimentación animal y agua</p> <p>Preparación, producción, conservación y ensayos de rendimiento de los medios de cultivo</p> <p>(ISO 11133:2014)</p> <p><i>Microbiology of food, animal feed and water. Preparation, production, storage and performance testing of culture media. (ISO 11133:2014).</i></p> <p><i>Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau. Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture. (ISO 11133:2014).</i></p>
CORRESPONDENCIA	<p>Esta norma es la versión oficial, en español, de la Norma Europea EN ISO 11133:2014, que a su vez adapta la Norma Internacional ISO 11133:2014.</p>
OBSERVACIONES	<p>Esta norma anula a las Normas UNE-CEN ISO/TS 11133-2:2006, UNE-CEN ISO/TS 11133-1:2009 y UNE-CEN ISO/TS 11133-2:2006/A1:2011.</p>
ANTECEDENTES	<p>Esta norma ha sido elaborada por el comité técnico AEN/CTN 34 <i>Productos alimentarios</i> cuya Secretaría desempeña FIAB.</p>

1 Objeto y campo de aplicación

Esta norma internacional define una serie de términos relacionados con la garantía de la calidad de los medios de cultivo y especifica los requisitos para la preparación de medios de cultivo destinados al análisis microbiológico de los productos alimenticios para consumo humano y animal, de las muestras procedentes del entorno de producción de los productos alimenticios para consumo humano y animal, así como de todos los tipos de agua destinada al consumo o utilizada en la producción de los alimentos.

Estos requisitos son aplicables a todas las categorías de medios de cultivo preparados para su uso en laboratorios que realizan análisis microbiológicos.

Esta norma internacional también establece criterios y describe métodos para ensayar el rendimiento de los medios de cultivo. Esta norma internacional se aplica para fabricantes tales como:

- entidades comerciales que producen y/o distribuyen medios deshidratados o reconstituídos semi-acabados o listos para su uso;
- entidades no comerciales que proporcionan medios a terceros;
- laboratorios microbiológicos que preparan medios de cultivo para su propio uso.

Editada e impresa por AENOR
Deposito legal: M 27598-2014

© AENOR 2014
Reproducción prohibida.

LAS OBSERVACIONES A ESTE DOCUMENTO HAN DE DIRIGIRSE A:

AENOR Asociación Española de Normalización y Certificación

Ciudad, 6
28004 MADRID-España

info@aenor.es
www.aenor.es

Tel: 902 102 201
Fax: 913 104 602

96 Páginas

Este documento ha sido adoptado por AGROLAB INGENIERÍA, S.L.U. el 7 de Octubre de 2014.
Para poder utilizarlo en un sistema de red interna, deberá disponer de la correspondiente licencia de AENOR.



3.3.5.2 medio preparado a partir de formulaciones comerciales deshidratadas:

Medio seco que requiere de su rehidratación y procesamiento antes de su uso, cuyo resultado es uno de los siguientes dos tipos de medios:

- un medio completo;
- un medio incompleto al cual se añaden los suplementos antes de su uso.

EJEMPLOS Productos liofilizados, en gránulos compactados, en polvo.

3.3.5.3 medio preparado a partir de sus componentes individuales:

Medio fabricado completamente en un laboratorio de microbiología a partir de sus ingredientes individuales.

3.4 Terminología relacionada con los microorganismos de ensayo

3.4.1 microorganismo diapa:

Microorganismo utilizado de forma general para el ensayo del rendimiento de los medios de cultivo.

NOTA 1 Los microorganismos diapa se definen más detalladamente en función de su origen (véase 3.4.2 y 3.4.7).

3.4.2 cepa de referencia:

Microorganismo obtenido directamente de una colección de cultivos de referencia, por ejemplo una colección de cultivos miembro de la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC; World Federation of Culture Collections) o de la Organización Europea de Colecciones de Cultivos (ECCO; European Culture Collections Organization) y definido como mínimo a nivel de género y especie, catalogado y descrito conforme a sus características y preferiblemente procedente de productos alimenticios para consumo humano o animal, de un entorno de producción de alimentos para consumo humano o animal, o de agua, según corresponda.

3.4.3 lote de reserva de referencia:

Una serie de cultivos individuales idénticos preparados en el laboratorio o por un proveedor mediante un único subcultivo a partir de una cepa de referencia.

3.4.4 cultivo de reserva:

Cultivo primario procedente de un lote de reserva de referencia.

3.4.5 cultivo de trabajo:

Subcultivo procedente de un lote de reserva de referencia o de un cultivo de reserva o de un material de referencia, certificado o no.

3.4.6 material de referencia, RM:

Material que contiene una cierta cantidad de microorganismos viables, suficientemente homogéneo y estable en relación a la cantidad de microorganismos viables, y del que se ha establecido que resulta adecuado para el uso al que está destinado en un proceso de medida.

NOTA 1 Véase la referencia [1] de la bibliografía.

3.4.7 material de referencia certificado, CRM:

Material de referencia caracterizado por un procedimiento de cuantificación de microorganismos viables metrologicamente válido, acompañado por un certificado que proporciona el valor de la cantidad indicada de microorganismos viables, junto con la incertidumbre asociada y la declaración de la trazabilidad metroológica.

NOTA Véase la referencia [1] de la bibliografía.

5.3.2 Microorganismos de ensayo de origen comercial

Si se obtienen microorganismos de ensayo a partir de colecciones de referencia o de proveedores comerciales certificados para la Norma ISO 9001[2] u otra certificación adecuada, y conservados en sus recipientes originales, se deben observar las indicaciones del proveedor sobre su cultivo y empleo.

El laboratorio debería asegurarse si la cepa suministrada es una cepa de referencia o un cultivo de reserva de referencia y a cuántos pasos se ha sometido antes de su recepción, junto a la documentación de dicha información.

El laboratorio también debería comprobar que posee las características esperadas.



Cepas suministradas por IELAB

Cultivo en medio sólido en laboratorio propio (mensual)

Cultivos en medio líquido exponenciales para estandarizar (semanal)



5.3.3 Lote de reserva de referencia preparados en el laboratorio

Los lotes de reserva de referencia preparados a partir de las cepas de referencia (véase la figura B.1) destinados al ensayo del rendimiento deben conservarse y manipularse de forma que se reduzcan las posibilidades de contaminación cruzada, de mutación o de alteración de sus características típicas. Los lotes de reserva de referencia deberán almacenarse en múltiples alícuotas, normalmente ultra-congeladas por ejemplo por debajo de -70 °C, o liofilizadas. A temperaturas mayores, la duración de la viabilidad podría reducirse y aparecer modificaciones genéticas.

Deberán documentarse de forma completa sus características de crecimiento para cada uno de los medios en profundidad o en la superficie de los cuales se utilizarán como microorganismos de ensayo.

Los cultivos de reserva de referencia no se deben utilizar para preparar cepas de referencia.

5.3.4 Cultivos de reserva

Los cultivos de reserva suelen prepararse a partir de cultivos de reserva de referencia ultra-congelados o liofilizados (véase la figura B.2). Las alícuotas se deben manipular de forma que se evite la posible contaminación cruzada del cultivo de reserva de referencia y/o su deterioro. Los cultivos de reserva deberán prepararse resuspendiendo una alícuota del cultivo de reserva de referencia en profundidad o en superficie de un medio de crecimiento no selectivo, seguido de incubación hasta conseguir un cultivo en fase estacionaria.

Consultarse el apartado 5.3.3 sobre los requisitos de almacenamiento y documentación.

Si se utilizan sistemas de conservación comerciales, deben seguirse de forma estricta las indicaciones del fabricante.

Los cultivos de reserva no se deben utilizar para preparar cepas de referencia o lotes de reserva de referencia.

5.3.5 Cultivos de trabajo

Se preparan cultivos de trabajo a partir de los cultivos de reserva o de los lotes de reserva de referencia y se utilizan para preparar inóculos para los ensayos.

Los cultivos de trabajo no se deben utilizar para preparar cepas de referencia, lotes de reserva de referencia o cultivos de reserva, o para preparar cultivos de trabajo adicionales.

5.4 Microorganismos para las pruebas de rendimiento

5.4.1 Generalidades

En los anexos E y F se relacionan microorganismos adecuados para los ensayos de rendimiento de rutina.

Los volúmenes de los inóculos y el número de organismos utilizados es crítico; véanse los capítulos 5.4.2.4 y 5.4.2.5.

Las siguientes directrices se ofrecen como ejemplo de procedimientos adecuados para preparar inóculos normalizados para el control de calidad de los medios. Dichos procedimientos se aplican de forma general pero algunos organismos pueden necesitar condiciones de preparación especiales, como los organismos anaerobios, halofílicos, osmofílicos, xerofílicos o los mohos, que presentan requisitos nutricionales o de crecimiento especiales.

5.4.2 Preparación

5.4.2.1 Preparación de los cultivos de reserva

Cuando se necesite, se inocula un medio sólido, como agar de triptona soja (TSA) o TSA Sangre, con un cultivo de reserva de referencia, de forma que se obtengan colonias individuales. Se incuba en condiciones apropiadas, es decir, de 18 h a 24 h a 37 °C para las bacterias aerobias.

Se inspecciona la pureza de este cultivo de reserva sólido y se utiliza durante un tiempo determinado (por ejemplo durante 14 días a una temperatura adecuada para evitar cambios significativos, en función de cada microorganismo).

5.4.2.2 Preparación de los cultivos de trabajo

Los cultivos de trabajo deben prepararse a partir del lote de reserva de referencia (o cuando se necesite, del cultivo de reserva) en forma de cultivo puro en fase estacionaria en un caldo no selectivo. Para la mayor parte de las bacterias aerobias se suele alcanzar tras una incubación de 18 h a 24 h.

El cultivo de trabajo puede prepararse a partir de un material de referencia comercial, RM o CRM, o bien puede prepararse en el laboratorio. La concentración de la suspensión preparada debe ser estable y homogénea durante su período de uso.^{[1][4][12][20][24]}

Pueden utilizarse distintas técnicas, pero todas deben garantizar la pureza del inóculo, así como su normalización, lo que permitirá su uso en una etapa posterior.

Según el tamaño de las colonias, se recogen una o dos colonias del medio de cultivo de reserva utilizando un asa de siembra. Se recomienda usar un asa de 1 µl para evitar que el inóculo sea demasiado voluminoso.

Se transfiere el inóculo a un medio líquido no selectivo, como por ejemplo caldo de soja triptona (TSB) y se mezcla cuidadosamente utilizando un mezclador de tipo vórtex.

Se incuba en las condiciones adecuadas y durante el tiempo adecuado (para la mayor parte de las bacterias aerobias a 37 °C durante 18 h a 24 h).

Este cultivo de trabajo se utiliza durante un tiempo determinado (es decir, durante un máximo de tres días a una temperatura adecuada, para evitar cambios significativos en función de cada organismo).

Consultarse las referencias ^{[1][4][12][20][24]} de la bibliografía sobre la preparación y el almacenamiento de esporas de hongos y bacterias como cultivos de trabajo.

5.4.2.3 Preparación de suspensiones (inóculos) para el ensayo

Se preparan diluciones seriadas en un diluyente adecuado (por ejemplo solución salina de peptona, disolución de Ringer's de concentración 1/4) y se utiliza el grado de dilución adecuado para conseguir el número de organismos deseado (ufc) en un volumen determinado.

Debería determinarse la dilución adecuada que se va a utilizar como inóculo de ensayo a partir de ensayos previos, realizados en todas sus etapas bajo condiciones estrictamente normalizadas.

Las suspensiones (los inóculos) se utilizan dentro de un tiempo definido (por ejemplo de hasta 2 h a temperatura ambiente o antes de 24 h si se conservan a una temperatura de 5 °C ± 3 °C; pueden resultar aceptables unos períodos de almacenamiento más prolongados siempre que se hayan validado.^{[1][4][21]})

Pueden utilizarse inóculos congelados siempre que pueda demostrarse que dicho microorganismo puede sobrevivir durante el período estocado.

5.4.2.4 Volúmenes de inóculo

Los volúmenes de inóculo utilizados en los ensayos cuantitativos de rendimiento deben reflejar los utilizados en las condiciones de ensayo de los correspondientes medios.

En el caso de los diluyentes y los medios líquidos utilizados en los ensayos cuantitativos, el volumen de inóculo debe estar en la misma proporción utilizada en cada norma internacional específica, por lo general de un 10% del medio sometido a ensayo.



Tabla K.1 – Microorganismos de ensayo y criterios de rendimiento para los medios de cultivo utilizados habitualmente en microbiología de los alimentos

Medios selectivos para detección de microorganismos											
Medio*	Tipo†	Microorganismo	Norma internacional	Propósito	Condiciones	Capa de cultivo	Número WDCM‡	Método de referencia	Método de control	Criterio	Reactivos característicos
Agar Lactosa azúcarosa + Bilescint + Agar†	S	Lactaria monocitogenes	ISO 11290-2	Productividad	(48 ± 6)h / (27 ± 1) °C	Lactaria monocitogenes de Lactaria monocitogenes 1G	00014*	TSA	Cuantitativo	$P_2 \geq 0,5$	Cálculos de color verificables con foto óptico
				Reactividad		Lactaria coliformes	00011 a 00013 00015 00017	-	Cualitativo	Indicador total (2)	-
				Reactividad		Lactaria lactosa	00017	-	Cualitativo	-	Cálculos de color verificables con foto óptico
DAR-2 agar	B	Streptococcus coprofaecium	ISO 6884-1	Productividad	48 (24 ± 2)h a (48 ± 2)h / (27 ± 1) °C	Streptococcus coprofaecium	00016* 00017	TSA	Cuantitativo	$P_2 \geq 0,5$	Cálculos de color (grm) o negro por foto óptico (muestras de contaminación de zonas de baño)
				Reactividad		Lactaria coliformes	00011 a 00013 00015	-	Cualitativo	Indicador total (2)	-
				Reactividad		Streptococcus agalactiae Streptococcus agalactiae de	00016* 00017	-	Cualitativo	-	Cálculos de color (grm) o negro por foto óptico (muestras de contaminación de zonas de baño)
BLL-5B	L	Coliformos	ISO 4971	Productividad	48 (24 ± 2) h a (48 ± 2) h / (28 ± 1) °C	Lactaria coliformes	00012* 00013	-	Cualitativo	Turbidez (2) y gas en recipientes de Durham	Turbidez y producción de gas
				Reactividad		Streptococcus faecalis	00016 00017	-	Cualitativo	Indicador total de producción de gas	-
				Reactividad		Streptococcus faecalis	00016 00017	-	Cualitativo	-	-
CPC	B	Pseudomonas spp	ISO 1722	Productividad	(48 ± 6)h / (27 ± 1) °C	Pseudomonas fluorescens Pseudomonas spp	00112* 00113	TSA	Cuantitativo	$P_2 \geq 0,5$	-
				Reactividad		Lactaria coliformes	00011 a 00013 00015	-	Cualitativo	Indicador total (2)	-
DCL14	S	Molise y levaduras	ISO 2157-2	Productividad	3 días / (28 ± 1) °C	Saccharomyces cerevisiae Candida albicans Aspergillus niger Candida albicans	00014* 00112* 00113 00114	MEA	Cuantitativo	$P_2 \geq 0,5$	Cálculos por ojo de observación (muestras de sala de cocina)
				Reactividad		Lactaria coliformes Bacillus subtilis spp. spizizenii	00112 a 00117* 00200	-	Cualitativo	Presencia de colonias	-

ISO 11133:2014

52

ABNOR



AGROLAB GROUP Your labs. Your service.

Los cultivos de trabajo, son empleados en:

- Cálculo Reproducibilidad (diario en cada sesión de análisis y parámetro)
- Cálculo Recuperación (mensual por parámetro)
- Controles de Eficacia de medios de cultivo preparados en el laboratorio



AGROLAB GROUP Your labs. Your service.

Inconvenientes uso MR IELAB:

- Dificultad en recuperar el valor certificado por el fabricante
- Equivalencia con nombre WDCM no presente en el informe ni en catálogo de venta
- Cálculo de valor certificado, no siempre en medio TSA que es el mayoritario en la ISO 11133



AGROLAB GROUP Your labs. Your service.

Ventajas uso MR IELAB:

- Condiciones de envío adecuadas: hielo seco
- Presentación de fácil manejo
- Pasos de reconstitución rápidos y sencillos
- Certificado del material junto al envío
- Estabilidad del material a lo largo del tiempo
- Buena relación calidad-precio



CERTIFICADO DE ANÁLISIS ielab

BAControl -5

Certifica
ielab Calidad, S.L.
C/ Dracma, 16
Pol. Ind. Las Atalayas
03114 Alicante (España)
T + 34 966 10 55 01 - F + 34 966 10 55 03

Estudio de certificación
Laboratorio: fabricante

Condiciones de análisis
Diluciones: hasta 10⁸
Volumen analizado: 3 mL
Método: Filtración
Temperatura de incubación: 37 ± 1°C
Tiempo de incubación: 24 ± 2 horas

Descripción
Código: I060059
Microorganismo: *Escherichia coli* V6 trazable con ATCC 25922, con menos de dos pases desde la cepa biotilizada empleada.
Lote nº: REC27063
Fecha de preparación: 27/06/2013
Fecha de caducidad: 27/12/2013

Material fungible sometido
Medio de cultivo: Tergitol-7 agar
Suplementos: TTC
Membranas de filtración: Ésteres de celulosa

Pruebas de autenticidad
Secuenciación de rDNA 16S

Condiciones de conservación
Conservar a -18°C

Controles de calidad
Contaminación: Correcto
Homogeneidad: Homogéneo
Estabilidad: Estable

Resultados
Número de ensayos: 50
Valor medio por pastilla: 5,62 log (4,16x10⁸ ufc)
Intervalo de confianza: 2,12x10⁸ - 8,18x10⁸ ufc

Uso preferente
Controles de calidad rutinarios (control de proceso, gráficos de control y control de calidad de medios de cultivo).

Condiciones de reconstitución
Diluyente: Agua estéril
Volumen: 20 mL
Tiempo de reconstitución: 10 minutos

Alicante, 19 de julio de 2013.
Director de Producto

ielab
comercial@ielab.es
www.ielab.es



AGROLAB GROUP Your labs. Your service.

**GRACIAS POR
SU ATENCIÓN**