
	Procedimiento para la determinación de <i>bacillus cereus</i> por el método recuento en placa AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-023
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-10

Procedimiento para la determinación de *bacillus cereus* por el método recuento en placa

AOXLAB S.A.S

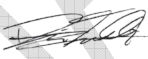


CONFIDENCIAL

	Procedimiento para la determinación de <i>Bacillus cereus</i> por el método recuento en placa AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-023
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-10

DOCUMENTO CONTROLADO

PROC-TC-023 DETERMINACIÓN DE *Bacillus cereus* POR EL MÉTODO RECUENTO EN PLACA


Copia controlada No. :1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	Duvan F. Torrado Garcia	Analista de microbiología		2023-02-10
Revisó:	Angela P. Patiño Pérez	Directora Calidad		2023-02-10
Aprobó:	Dario Pardo Pardo	Director Técnico		2023-02-10
Localización del documento:		http://107.190.139.42/~aoxlabsgc/sig/		

Control de Cambios

Estado	Fecha de Inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Obsoleto	2018-01-19	1	Ninguno (versión original).	LVLS	NBR	YELP
Vigente	2023-02-10	2	Se cambia estilo según manual identidad	DFTG	APPP	DPP

Sección	Página
1. OBJETIVO Y ALCANCE.	4
1.1 Objetivo.	4
1.2 Alcance.	4
2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.	4
2.1 Definiciones.	4
2.2 Notaciones.	4
3. REFERENCIAS.	5
4. PATRONES DE MEDIDA.	5
5. INSPECCIÓN VISUAL	5
5.1 Revisión general.	5
5.2 Estabilización.	5
5.3 Verificación de patrones y otros equipos.	5
5.4 Manejo del ítem.	6
5.5 Medidas de seguridad.	6
6. INSTRUCCIONES DE ENSAYO.	6
6.1 Preparación de soluciones	6
6.2 Preparación de las diluciones seriadas para recuento en placa	7
6.3 Siembra por superficie o extensión	7
6.4 Siembra en profundidad	8
6.5 Recuento de UFC y Cálculos	8
6.6 Pruebas de Confirmación	9
6.7 Resultados de las diferentes pruebas confirmatorias	10
6.8 Recuento en Placa utilizando la metodología de Compact Dry X-BC	10
6.9 Instrucciones de uso	10
7. INFORME.	11
8. RESPONSABILIDADES.	11
8.1 Líder de Calidad.	11
8.2 Líder de Laboratorio.	11
8.3 Analistas.	11
9. FORMATOS RELACIONADOS.	12
10. ANEXOS.	12

	<p>Procedimiento para la determinación de <i>Bacillus cereus</i> por el método recuento en placa</p> <p>AOXLAB S.A. S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-023</p>
		<p>Revisión: 2</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2023-02-10</p>

1. OBJETIVO Y ALCANCE

1.1 OBJETIVO: Determinar el contenido de Unidades formadoras de colonia (UFC) de *Bacillus cereus* mediante la técnica de recuento en placa.

1.2 ALCANCE: Aplica para el personal técnico del Laboratorio.

2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

2.1 Definiciones

Bacillus cereus[3]: es una bacteria ubicua formadora de esporas que ha sido vinculada con algunos aspectos beneficiosos y nocivos para la actividad económica de la sociedad. Esta bacteria es frecuentemente encontrada como saprofito en el suelo, agua, vegetación y aire, desde los cuales se transfiere muy fácilmente a los alimentos. La colonización de diferentes nichos ecológicos es posible debido a su buena adaptabilidad y resistencia a variadas influencias. *B. cereus* produce endosporas que sobreviven a la pasteurización y son resistentes a varios desinfectantes. Además, produce enzimas como lipasas, proteasas, xilanasas y otras.

El Recuento en placa [1,2]: es un método muy utilizado cuando se necesita determinar el tamaño de la población bacteriana de una muestra. El recuento de microorganismos, en este caso, se basa en que cada uno desarrollará una colonia visible. Pero debido a que una muestra no es totalmente homogénea con respecto a su composición microbiológica, es posible que una colonia se origine de un microorganismo o de cientos de ellos, dando en este último caso un recuento menor del real. También es posible que muchas de las bacterias presentes en la muestra no puedan crecer en las condiciones elegidas (pH, temperatura, medio de cultivo, etc.).

2.2 Notaciones.

Para propósitos de este documento, se hacen las siguientes consideraciones:

“**Laboratorio**”: se refiere al laboratorio AOXLAB S.A.S.


“**Informe de resultados**”: se refiere a los informes de ensayo que emite el Laboratorio.

“**Servicios**”: para referir a los servicios de ensayo que el Laboratorio ofrece.

3. REFERENCIAS

[1] **NTC4491-1:** Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Preparación de muestras para ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para análisis microbiológico. Parte 1: reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y de diluciones decimales.

[2] **NTC4092:** Microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. Requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos.

	Procedimiento para la determinación de <i>Bacillus cereus</i> por el método recuento en placa AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-023
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-10

[3]NTC4679: microbiología. método horizontal para el recuento de *Bacillus cereus* técnica de recuento de colonias

4. PATRONES DE MEDIDA.

Tubos de ensayo	Cámara o cabina de Siembra
Cajas Petri con medio de cultivo	Autoclave
Pipetas de 1 y 10 ml	Asa y/o rastrillo microbiológico
Gradillas	Material de vidrio necesario
Stomacher	Cámara de anaerobiosis
Incubadora	Bolsa de anaerobiosis o anaerogen

- Material debidamente lavado, secado y esterilizado (Ver PROC-TC 026-027)

5. INSPECCIÓN VISUAL.

5.1 Revisión general.

Al recibirse el ítem en el Laboratorio, éste es inspeccionado a fin de asegurar que se recibe en condiciones normales de operación y presentación física; y detectar cualquier anomalía en su recepción. Esta revisión es realizada conforme lo indicado en el procedimiento PROC-TC-009 Procedimiento de aseguramiento de integridad de las muestras bajo servicio

5.2 Estabilización.

Una vez revisado el ítem, se aplican las siguientes instrucciones:


Los patrones de referencia del laboratorio a intervenir en el ensayo y el ítem se mantienen en el lugar de ensayo, y encendidos (si es el caso), por lo menos una hora antes de realizar las mediciones, a fin de lograr su operación óptima o estabilización térmica. Se registra la hora de inicio y fin de esta estabilización.

Verificar y registrar en los formatos SOFT-TC-001 "Formato carta de control para humedad" y SOFT-TC-002 "Formato carta de control para temperatura ambiente" que las condiciones ambientales de afectación en el servicio se cumplan durante el ensayo del ítem:

Condición ambiental	Mínima	Máxima	Observación
Temperatura ambiente	19,00	27,00	
Humedad relativa	35,00	65,00	

Estas condiciones ambientales fueron identificadas con un efecto en el servicio realizado y sus límites permisibles fueron definidos en base a de los propios patrones del laboratorio, recomendaciones de normas aplicables y servicios realizados.

5.3 Verificación de patrones y otros equipos.

	Procedimiento para la determinación de <i>Bacillus cereus</i> por el método recuento en placa AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-023
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-10

- Stock de los reactivos y medios de cultivo a utilizar en el proceso, fichas de bioseguridad y matriz de compatibilidad.
- Fecha de vencimiento de los reactivos y medios de cultivo.
- Cantidad necesaria a utilizar o preparar de reactivo o medio de cultivo dependiendo del número de muestras.
- Bitácora de uso de equipos y gasto de medios de cultivo.

Antes de cualquier uso de los equipos se debe revisar la carpeta de mantenimientos y calibraciones, verificar que el equipo se encuentra en las condiciones adecuadas para su uso y no requiere alguna intervención.

A fin de confirmar que los patrones de referencia a utilizar en el ensayo se encuentran en condiciones adecuadas para realizar el servicio, se realiza una verificación intermedia de acuerdo a PROC-TC-005 "Procedimiento de verificaciones intermedias de equipo."

5.4 Manejo del ítem.

Para la configuración y operación del ítem, se siguen las instrucciones del manual del fabricante y/o la normativa vigente.

Para la identificación, manejo, transporte, almacenamiento y preparación del ítem se siguen las siguientes instrucciones del procedimiento PROC-TC-009 Procedimiento de aseguramiento de integridad de las muestras bajo servicio.

5.5 Medidas de seguridad.


Se deben seguir las medidas de seguridad durante la realización del servicio las cuales puede encontrar en el procedimiento PROC-GC-015 Procedimiento estándar de Bioseguridad.

Verificar que todos los reactivos preparados en el laboratorio al momento de realizar el ensayo o los que se encontraban almacenados se encuentren identificados conforme al formato FOR-TC-024 "Formato para rotular reactivos elaborados en el laboratorio"

6. INSTRUCCIONES DE ENSAYO.

6.1 Preparación de soluciones

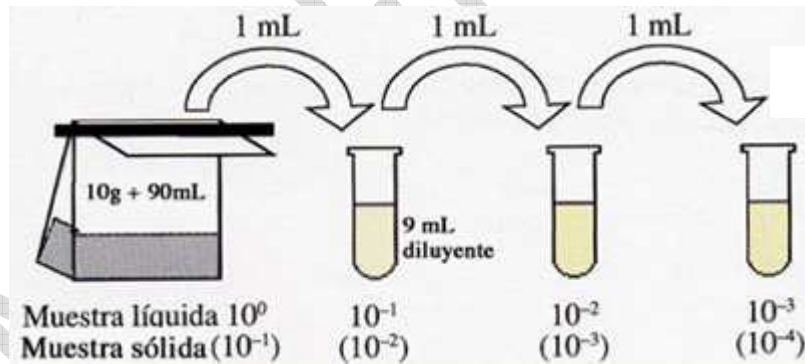
Solución	Cantidad reactivo	Cantidad Solvente	Observaciones
Agar Selectivo para <i>B. cereus</i> .	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar 15 a 20 ml por cada caja de Petri.
Agar PEMBA (<i>Bacillus cereus</i>)	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar 15 a 20 ml por cada caja de Petri.
Solución de Polimixina B	Sulfato de polimixina B 50mg	Agua destilada estéril 50ml	Se disuelve el reactivo en agua y se

	Procedimiento para la determinación de <i>Bacillus cereus</i> por el método recuento en placa AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-023
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-10

			esteriliza por filtración.
Emulsión de Yema de Huevo	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Suplemento de medio de cultivo.
Agar MYP (Agar selectivo + polimixina B + Emulsión de yema de huevo)	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar 15 a 20 ml por cada caja de Petri.
Agua Peptonada estéril	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar 9 ml por cada tubo de ensayo.

6.2 Preparación de las diluciones seriadas para recuento en placa

Transfiera 1 ml de la muestra original al tubo 1 con 9 ml de medio de cultivo o solución buferada diluyente. Repita este procedimiento de tubo en tubo hasta obtener la dilución deseada.



Grafica 1: Diluciones seriadas

Nota: Tenga en cuenta el factor de dilución dependiendo de la naturaleza de la muestra (líquida o sólida).

Para la siembra en la caja Petri con el medio de cultivo, tenga en cuenta que lo puede hacer en siembra por superficie o siembra en profundidad.

6.3 Siembra por superficie o extensión (Ver gráfico 2)

1. Inocule 0.1ml de la muestra sobre el medio de cultivo ya solidificado y esparza con un asa o rastrillo microbiológico uniformemente sobre la superficie del agar. Selle la caja con papel parafilm o vinipel por el borde y lleve a incubación a 30°C ± 1°C durante 24 horas.



Grafica 2: Siembra por superficie

6.4 Siembra en profundidad

2. Inocular, 1.0 mL de la dilución correspondiente en cada caja, mediante pipeta estéril y verter de 12.0 a 15.0 mL del medio de cultivo fundido y mantenido a $45 \pm 1.0^\circ\text{C}$ en baño de agua. El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el momento en que se vierte el medio de cultivo, no debe exceder de 20 minutos.
3. Mezclar cuidadosamente el inóculo con el medio, mediante movimientos de derecha a izquierda, movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, movimientos en el sentido contrario al de las manecillas del reloj y de atrás para adelante, sobre una superficie lisa y nivelada.
4. Permitir que la mezcla solidifique dejando las cajas Petri sobre una superficie horizontal fría. No permitir que se mojen las tapas de las cajas.
5. Preparar una caja control con 18.0 a 20.0 mL de medio para verificar la esterilidad.
6. Solidificado el medio invertir las placas y colocarlas en la incubadora a $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas.


6.5 Recuento de UFC y Cálculos

Realizar el recuento de los microorganismos presentes en la muestra. Para realizar el contaje se debe tener en cuenta:

- Contar las placas cuyo número de colonias esté comprendido entre 50 y 150.
- Multiplicar por el factor de dilución y el volumen inoculado.
- Expresar el resultado en UFC/g o ml de alimento. (NO en bacterias por gramo o mililitro)

$$\text{UFC/g o ml} = \text{N}^\circ \text{ de colonias en placa (entre 50 y 150)} \times \text{inverso de la dilución} \times 10$$

6.6 Pruebas de Confirmación


	Procedimiento para la determinación de <i>Bacillus cereus</i> por el método recuento en placa AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-023
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-10

Seleccionar 5 o más colonias características de las placas y transferir a tubos con agar nutritivo para confirmar la presencia de *B. cereus*, siguiendo la técnica que se describe a continuación.

Calcular el número de *B. cereus*/g de muestra, basado en el porcentaje de colonias, probadas y confirmadas.

1. Confirmación de *B. cereus* Tomar 5 o más colonias sospechosas provenientes de agar MYP (o su equivalente) y transferir a tubos con agar nutritivo. Incubar 24 horas a 30°C. Preparar una tinción de Gram y observar microscópicamente. El *B. cereus*, en el microscopio se presenta como bacilo Grampositivo corto, forma cadenas, las esporas pueden ser elipsoidales, centrales o subterminales. Transferir 3 asadas de cada tubo de agar nutritivo a 0.5mL de buffer de fosfatos y mezclar en el vórtex. Utilizar esta suspensión e inocular los siguientes medios confirmatorios, (también se puede utilizar el inóculo del tubo de agar nutritivo sin diluir en buffer).
2. Caldo glucosa + rojo de fenol Inocular 3 mL de caldo glucosa rojo de fenol con 1 asada del cultivo descrito en el punto anterior. Incubar anaeróbicamente 24 horas a 35°C en jarra de anaerobiosis. Agitar los tubos después de la incubación y observar si se presenta un vire de color que va de rojo al amarillo, lo que indica la producción de ácido, en condiciones anaeróbicas a partir de la glucosa.
3. Caldo nitratos Inocular 5 mL de caldo nitratos con 1 asada de cultivo descrito en el inciso C. incubar 24 horas a 35°C. Para probar los nitratos, añadir 1.25 mL de los reactivos A y B a cada cultivo (*Reactivos para detección de nitratos A (ácido sulfánico) y B (N-(1, naftil) etiléndiamina*). El desarrollo de un color rojo-naranja en 10 minutos indica la reducción de nitratos a nitritos.
4. Medio VogesProskauer(VP) Inocular 5 mL del medio VP con una asada de cultivo descrito en el paso 1. incubar 48+ 2 horas a 35°C. A cada mL de cultivo añadir 0.6 mL de α -naftol y 0.2 mL de KOH. Agitar y observar el resultado después de 1 hora a temperatura ambiente. La prueba es positiva de producción de acetil metil carbinol, si se desarrolla un color rosa o violeta.
5. Agar tirosina Inocular toda la superficie del agar con una asada del cultivo. Incubar a 35°C por 48 horas. Observar aclaración de las zonas cercanas al desarrollo, que indica la descomposición de la tirosina, examinar las placas negativas con signos obvios de desarrollo e incubar hasta por un total de 7 días antes de considerar la prueba como negativa.
6. Agar MYP (o medio de cultivo equivalente) Inocular las placas de agar MYP, con el cultivo descrito en el paso 1, con la finalidad de confirmar pureza, lecitinasa y manitol de la cepa aislada. Incubar 24 horas a 35°C. Observar la producción de lecitinasa alrededor de las colonias (halo transparente). El *B. cereus* no fermenta el manitol en el agar MYP ni tampoco en el agar para *B. cereus* (OXOID).

6.7 Resultados de las diferentes pruebas confirmatorias

	Procedimiento para la determinación de <i>Bacillus cereus</i> por el método recuento en placa AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-023
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-10

- 1) Bacilo Gram-positivo largo esporulado que no deforma el esporangio
- 2) Productor de lecitinasa y no fermenta el manitol
- 3) Crece y produce ácido a partir de la glucosa
- 4) Reduce los nitratos a nitritos (unos cuantos tipos pueden ser negativos)
- 5) Produce acetil-metil-carbinol (VP positivo)
- 6) Descompone la L-tirosina.

6.8 Recuento en Placa utilizando la metodología de Compact Dry X-BC

Compact Dry™ X-BC es una placa cromogénica lista para usar en el recuento total de gérmenes vivos.

Método de uso del Compact Dry X-BC

Para agua y alimentos líquidos:

Aplique 1ml de la muestra (diluya si es necesarios) en el centro de la placa de compact dry TC.

Para alimentos sólidos:

Agregue una solución buferada de 90 ml a la muestra (10 gramos), homogenícela en el Stomacher (diluya en caso de ser necesario). Aplique 1ml de la muestra en el centro de la lámina seca de Compact Dry X-BC.

6.9 Instrucciones de uso


1. Abra la cubierta y deje caer 1ml de la muestra sobre la parte central de la placa.
2. La muestra se dispersa automática y homogéneamente sobre la lámina, y transforma la lámina seca en un gel en pocos segundos.
3. Vuelva a colocar la cubierta sobre la placa.
4. Gire la placa cerrada y colóquela en la incubadora.
5. Después de la incubación, cuente el número de colonias coloreadas en la parte posterior de la placa. El papel blanco colocado debajo de la placa le ayudará a contar las colonias.

Temperatura de Incubación: 30 ± 1°C

Tiempo de Incubación: 24 ± 2 Horas

Incubación: Debe ser registrada en el formato FOR-TC-015

Interpretación de Resultados con el Compact Dry X-BC

	Procedimiento para la determinación de <i>Bacillus cereus</i> por el método recuento en placa AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-023
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-10

B. cereus forma colonias levemente azules por el contenido cromogénico en el medio.

Sin embargo, algunas otras bacterias, que no son *B. cereus* pueden también crecer y formar colonias blancas en esta placa.

NOTA: Solamente las colonias azules deben ser contadas.

7. INFORME

Registro manual en los formatos del laboratorio: todas las anotaciones derivadas del desarrollo del método incluyendo cálculos y/o procedimientos anexos a la preparación de muestras, preparación de medios de cultivo, diluciones y/u otros y los resultados en los correspondientes formatos FOR-TC-014 (Formato datos primarios de resultados de análisis Microbiológicos), FOR-TC-015 (Formato para el control de tiempos y temperaturas de incubación).

8. RESPONSABILIDADES.

8.1 Líder de Calidad.

Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.

8.2 Líder de Laboratorio.

Asegurar la aplicación del presente documento por el personal subordinado o supervisado.

8.3 Analistas.

Aplicar el presente documento.

9. FORMATOS RELACIONADOS.

SOFT-TC-001 "Formato carta de control para la humedad"

SOFT-TC-002 "Formato carta de control para la temperatura ambiente"

FOR-TC-024 "Formato para rotular reactivos elaborados en el laboratorio"

FOR-TC-014 "Formato datos primarios de resultados de análisis Microbiológicos"

FOR-TC-015 "Formato para el control de tiempos y temperaturas de incubación."

10. ANEXOS.

No aplica