



| | | |
|---|---|-----------------------------------|
|  | Procedimiento para la determinación de presuntos <i>Bacillus cereus</i> en alimentos por el método de recuento en placa AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-023 |
| | | Revisión: 4 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-10-22 |

Procedimiento para la determinación de presuntos *Bacillus cereus* en alimentos por el método de recuento en placa




AOXLAB S.A.S

| | | |
|---|--|---|
|  | Procedimiento para la determinación de presuntos <i>Bacillus cereus</i> en alimentos por el método de recuento en placa AOXLAB S.A. S | Identificación: PROC-TC-023 |
| | | Revisión: 4 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-10-22 |

DOCUMENTO CONTROLADO


PROC-TC-023 Procedimiento para la determinación de presuntos *Bacillus cereus* en alimentos por el método de recuento en placa

Copia controlada No. :1

| | Nombre | Puesto o función | Firma | Fecha |
|------------------------------------|------------------------|----------------------|---|------------|
| Elaboró: | Lorena Correa Restrepo | Líder de laboratorio |  | 2024-10-22 |
| Revisó: | Angela P. Patiño Pérez | Directora calidad |  | 2024-10-22 |
| Aprobó: | Jonatan Zárate Álvarez | Directora Técnico |  | 2024-10-22 |
| Localización del documento: | | Plataforma SGC | | |

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 |
| Obsoleto | 2023-02-10 | 2 | Se cambia estilo según manual identidad. | DFTG | APPP | DPP |
| Obsoleto | 2024-06-05 | 3 | Se cambia el nombre y se ajusta el procedimiento a los requisitos y/o lineamientos de la ISO 7932:2004 | DFTG | YLCR | LSGF |

| | | |
|---|--|--|
|  | Procedimiento para la determinación de presuntos <i>Bacillus cereus</i> en alimentos por el método de recuento en placa AOXLAB S.A. S | Identificación: PROC-TC-023 |
| | | Revisión: 4 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-10-22 |

| | | | | | | |
|---------|------------|---|---|------|------|------|
| Vigente | 2024-10-22 | 4 | Se organizan unidades de ml a mL de acuerdo con el SIU y se actualiza metodología en su última versión ISO 7932:2004/Amd 1:2020, se elimina ítem de informe de resultados | YLCR | APPP | JOZA |
|---------|------------|---|---|------|------|------|



| | | |
|---|---|--|
|  | <p>Procedimiento para la determinación de presuntos <i>Bacillus cereus</i> en alimentos por el método de recuento en placa</p> <p>AOXLAB S.A. S</p> | Identificación: PROC-TC-023 |
| | | Revisión: 4 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-10-22 |

Tabla de contenido

| | |
|--|-----------|
| 1. OBJETIVO Y ALCANCE | 5 |
| 1.1 Objetivo..... | 5 |
| 1.2 Alcance:..... | 5 |
| 2. DEFINICIONES Y NOTACIONES | 5 |
| 2.1 Definiciones..... | 5 |
| 3. REFERENCIAS | 6 |
| 4. DESARROLLO | 7 |
| 4.1 Principio del método..... | 7 |
| 4.2.1 Inspección de la muestra..... | 7 |
| 4.2.2 Estabilización..... | 7 |
| 4.2.3 Verificación de patrones y otros equipos..... | 8 |
| 4.2 Manejo del ítem..... | 8 |
| 4.3 Medidas de seguridad..... | 8 |
| 4.4 Patrones y equipos de medición..... | 9 |
| 4.5 Materiales y consumibles..... | 9 |
| 4.6 Instrucciones de ensayo..... | 9 |
| 4.6.1 Preparación de soluciones..... | 9 |
| 4.6.2 Inoculación e incubación..... | 10 |
| 4.6.3 Recuento de UFC y Cálculos..... | 12 |
| 4.6.4 Pruebas de Confirmación..... | 12 |
| 4.6.5 Prueba de hemólisis en agar sangre de cordero..... | 13 |
| 4.6.6 Pruebas confirmatorias complementarias..... | 13 |
| 4.7 Aseguramiento de la calidad..... | 14 |
| 5 RESPONSABILIDADES | 14 |
| 6 FORMATOS RELACIONADOS | 15 |
| 7 ANEXOS | 15 |

| | | |
|---|---|---|
|  | <p>Procedimiento para la determinación de presuntos <i>Bacillus cereus</i> en alimentos por el método de recuento en placa</p> <p>AOXLAB S.A. S</p> | <p>Identificación: PROC-TC-023</p> |
| | | <p>Revisión: 4</p> |
| | | <p>Inicio de vigencia: 2024-10-22</p> |

1. OBJETIVO Y ALCANCE

1.1 Objetivo

Este procedimiento establece un método para la determinación y el recuento de colonias presuntivas de *Bacillus cereus* utilizando la técnica de recuento en placa, incubando a 30°C ± 1°C.

1.2 Alcance:

Este método de prueba está basado en la norma ISO 7932:2004/Amd 1:2020, por lo que es aplicable a una amplia variedad de productos destinados al consumo humano, dentro de los cuales se incluyen, pero no se limitan a:

- Productos deshidratados o secos.
- Leche en polvo y derivados lácteos.
- Carnes y derivados cárnicos.
- Productos listos para el consumo humano.
- Productos refrigerados.
- Harinas y cereales.
- Suplementos alimenticios.

2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.


2.1 Definiciones

***Bacillus cereus* [1]:** Bacteria ubicua formadora de esporas que ha sido 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.

***Presunto de Bacillus cereus* [2]:** Microorganismo que forma colonias típicas en la superficie de un medio de cultivo selectivo y que da una reacción positiva en las condiciones especificadas en este procedimiento.

Recuento en placa [3]: Método muy utilizado para 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.

NOTA¹: Para contar con un método de prueba práctico, la etapa confirmatoria se ha limitado a los aspectos típicos en agar MYP y la prueba de hemólisis en agar sangre de cordero. Por lo tanto, se ha introducido el

| | | |
|---|---|---|
|  | <p>Procedimiento para la determinación de presuntos <i>Bacillus cereus</i> en alimentos por el método de recuento en placa</p> <p>AOXLAB S.A. S</p> | <p>Identificación: PROC-TC-023</p> |
| | | <p>Revisión: 4</p> |
| | | <p>Inicio de vigencia: 2024-10-22</p> |

término "presunto" para reconocer que esta etapa confirmatoria no permite distinguir *B. cereus* de otras especies como por ejemplo *B. anthracis* o *B. thuringiensis*.

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] NTC 4491-1. (2005). 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. [2005-08-24] – Primera actualización.

[2] ISO 7932:2004. Microbiology of food an animal feeding stuff – Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* – Colony count technique at 30°C. [2024-06-15] – Third edition.

[3] NTC4092. (2016). Microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. Requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos. [2016-12-07] – Segunda actualización.

| | | |
|---|--|--|
|  | Procedimiento para la determinación de presuntos <i>Bacillus cereus</i> en alimentos por el método de recuento en placa AOXLAB S.A. S | Identificación: PROC-TC-023 |
| | | Revisión: 4 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-10-22 |

4. DESARROLLO

4.1 Principio del método

El método para la determinación de *Bacillus cereus* en alimentos destinados al consumo humano se basa en su cultivo selectivo y recuento a partir de una muestra. La técnica aprovecha características específicas de la bacteria como su crecimiento a 30°C, resistencia a la sal, producción de enzimas y morfología colonial característica en agar selectivo. La muestra se siembra en diferentes diluciones en agar selectivo y se incubaba a 30°C durante 18-48 horas. Las colonias sospechosas se confirman con pruebas bioquímicas y tinción de Gram. El número de colonias confirmadas se extrapola para obtener el recuento final de *Bacillus cereus* por gramo o mililitro de muestra.

4.2 Actividades previas

4.2.1 Inspección de la muestra

Al recibirse la muestra en el Laboratorio, éste es inspeccionado a fin de asegurar que se garantizan las condiciones conforme lo indicado en el procedimiento PROC-TC-008 "Procedimiento de aseguramiento de integridad de los ítems bajo servicio".

Antes de iniciar el análisis, se debe verificar que la muestra se encuentra empacada y sellada adecuadamente y etiquetada con el sticker de identificación interna del laboratorio. Que las muestras que requieran refrigeración se entreguen en neveras con pilas de hielo. Se debe contar con al menos 50 gramos de muestra para realizar este análisis, para el caso de cannabis puede ser de 5 a 10 g en el caso de material vegetal y de 1 a 2 gramos para cristales y extractos.


En caso de que la muestra no presente alguna de estas condiciones, notificar de inmediato al del Líder de laboratorio para informar al área comercial y se le indique al cliente.

4.2.2 Estabilización.

Una vez revisada la muestra, se aplican las siguientes instrucciones:

Los patrones y equipos de referencia del laboratorio a intervenir en el ensayo como son las balanzas se mantienen en el lugar de ensayo encendidas, antes de realizar las mediciones, a fin de lograr su operación óptima o estabilización térmica. Las muestras que están en congelación deben retirarse del congelador y atemperarse hasta que adquieran un estado adecuado para realizar la toma de la porción analítica. Los ítems que no requieren refrigeración se mantienen en el lugar de ensayo para que tengan una estabilidad térmica. Las soluciones usadas para el ensayo deben atemperarse por 1 hora o colocarlas entre 15 y 20 minutos en la incubadora a 37 °C.

Debe verificarse que las condiciones ambientales del lugar de ensayo se encuentren en los intervalos que se muestran a continuación:

| | | |
|---|--|--|
|  | Procedimiento para la determinación de presuntos <i>Bacillus cereus</i> en alimentos por el método de recuento en placa AOXLAB S.A. S | Identificación: PROC-TC-023 |
| | | Revisión: 4 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-10-22 |

| Condición ambiental | Mínima | Máxima | Observación |
|----------------------|--------|--------|---|
| Temperatura ambiente | 18,00 | 25,00 | Condiciones establecidas por el laboratorio |
| Humedad relativa | 20,00 | 70,00 | Condiciones establecidas por el laboratorio |

Estas condiciones son monitoreadas y registradas automáticamente por el software 3sense del laboratorio y en caso de que se encuentren fuera de estos rangos deben suspenderse los análisis.

4.2.3 Verificación de patrones y otros equipos.

A fin de confirmar que los equipos a utilizar en el ensayo se encuentran en condiciones adecuadas para realizar el servicio, se inspecciona que se haya realizado la verificación diaria de los equipos de pesaje como la balanza gramera y el diluctor gravimétrico, de acuerdo con el procedimiento PROC-TC-005, se debe garantizar la desinfección de la cabina y que haya permanecido al menos 60 minutos con luz-UV encendida, se debe garantizar que antes de cada ensayo se realice una adecuada limpieza y desinfección de mesones e implementos a utilizar, además haber realizado una aspersion en los ambientes de acuerdo al PROC-TC-031.

Además, revisar 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 por utilizar o preparar de reactivo o medio de cultivo dependiendo del número de muestras.

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.


4.2 Manejo del ítem.

Para la identificación, manejo, transporte, almacenamiento y descarte de la muestra, se siguen las instrucciones dadas en el procedimiento PROC-TC-008 Procedimiento de aseguramiento de integridad de las muestras bajo servicio.

Al tomar de la porción de análisis, la muestra debe estar a temperatura ambiente y correctamente homogenizada a excepción de las muestras que requieran almacenarse en refrigeración.

4.3 Medidas de seguridad.

Se deben seguir las siguientes medidas de seguridad antes y durante la realización del servicio: 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" y garantizar que ninguno se encuentre vencido. En caso de que se encuentre alguna anomalía al respecto, avisar a la Dirección Técnica a través del Líder de Laboratorio.

| | | |
|---|--|--|
|  | Procedimiento para la determinación de presuntos <i>Bacillus cereus</i> en alimentos por el método de recuento en placa AOXLAB S.A. S | Identificación: PROC-TC-023 |
| | | Revisión: 4 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-10-22 |

Durante el análisis tener en cuenta que se debe seguir el procedimiento aquí descrito sin modificar ningún parámetro.

Tener en cuenta las instrucciones dadas en el reglamento interno de trabajo PROC-GC-015 Reglamento Interno AOXLAB S.A.S, capítulo XV.

4.4 Patrones y equipos de medición

Para realizar el ensayo se utilizan los siguientes equipos y componentes clave:

- Balanza gramera con resolución de 0.01 g
- Vortex
- Transfer pipeta de 1000 µl
- Transfer pipeta de 100 µl
- Baño de agua a 45 °C
- Cabina de bioseguridad
- Incubadora a 30° ± 1°C
- Homogenizador de muestras (Stomacher)
- Dilucult con resolución de 0.01 g (Equipo de pesaje y dilución de muestras)
- Nevera almacenamiento de medios entre 0-8 °C
- Computador

4.5 Materiales y consumibles


- Puntas para transfer pipeta de 1000 µL
- Puntas para transfer pipeta de 100 µL
- Bolsas whirl pak estériles 18 onzas
- Gradillas
- Cajas de Petri plásticas estériles de 90 a 100 mm
- Asa y/o rastrillo microbiológico
- Probeta de 100 mL previamente esterilizada
- Guantes de látex sin talco
- Aspersor

El material reutilizable debe haber sido previamente lavado, secado y esterilizado (Ver PROC-TC 026-027)

4.6 Instrucciones de ensayo.

4.6.1 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 Base | Según especificaciones de casa comercial | Según especificaciones de casa comercial | Preparar 15 a 20 mL por cada caja de |

| | | |
|---|--|--|
|  | Procedimiento para la determinación de presuntos <i>Bacillus cereus</i> en alimentos por el método de recuento en placa AOXLAB S.A. S | Identificación: PROC-TC-023 |
| | | Revisión: 4 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-10-22 |

| | | | |
|--|---|---|--|
| | | | Petri. |
| Agar completo o 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. |
| Solución de Polimixina B | Sulfato de polimixina B 5g | Agua destilada estéril 5mL | Se disuelve el reactivo en agua y se adiciona al agar estéril. |
| Agar Sangre Desfibrinada de Cordero | Preparadas y listas para usar | Preparadas y listas para usar | Disponer de la cantidad que se requiera según las pruebas de confirmación. |
| Agua Peptonada Estéril | Según especificaciones de casa comercial | Según especificaciones de casa comercial | Preparar 9 mL por cada tubo. |
| Emulsión de Yema de huevo | Ver Nota ² | Ver Nota ² | Ver Nota ² |

NOTA: Para la preparación de la emulsión de Yema de huevo es necesario utilizar huevos de gallina frescos con la cáscara intacta y seguir las siguientes instrucciones:

Lave los huevos con detergente líquido y un cepillo, luego enjuáguelos con agua corriente. Sumérjalos en etanol al 96% (v/v) durante 30 segundos y séquelos. Siguiendo un procedimiento aséptico, rompa cada huevo y separe la yema de la clara transfiriendo el contenido repetidamente de una mitad de la cáscara a la otra. Coloque las yemas en una probeta medidora esterilizada y agregue cuatro partes de agua esterilizada por cada parte de yema. Transfiera la mezcla asépticamente a un matraz estéril y mezcle vigorosamente.

Caliente la mezcla durante 2 horas en un baño de agua mantenido entre 44°C y 47°C y luego, deje reposar de 18 a 24 horas a 5°C ± 3°C para permitir la formación de un precipitado. Recoja asépticamente la emulsión sobrenadante para emplearla. Esta solución puede almacenarse a 5°C ± 3°C por un periodo máximo de 72 horas.

4.6.2 Inoculación e incubación

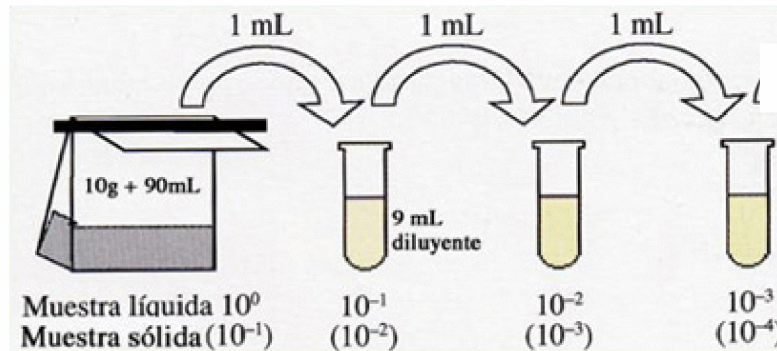
En caso de que el producto sea líquido, utilice una pipeta estéril para transferir directamente 0,1 mL de la muestra a cada caja de agar (Ver gráfica 1). Asegúrese de distribuir la muestra de manera homogénea sobre toda la superficie del agar para obtener resultados consistentes.

Para productos sólidos u otros tipos de muestras, prepare una suspensión inicial pesando 10 g y/o mL de la muestra y llevando el volumen total a 100 mL con agua Peptonada tamponada, de acuerdo con el procedimiento PROC-TC-199. A continuación, agregue 0,1 mL de esta suspensión a cada una de las placas de agar, asegurándose de distribuir la muestra de manera uniforme.



Grafica 1: Siembra por superficie.


Si se requiere, transfiera 1 mL de la suspensión original al tubo 1 que contiene 9 mL de medio de cultivo o solución diluyente. Repita este proceso de tubo en tubo hasta lograr la dilución necesaria según lo indicado en la gráfica 2. Este enfoque garantizará resultados más precisos, especialmente cuando se trabajan con muestras de alta concentración de microorganismos.



Grafica 2: Diluciones seriadas

Cuando se busca estimar números bajos de *B. cereus* spp en ciertos productos, es posible aumentar los límites de detección en un factor de 10, al examinar 1 mL de la muestra si el producto inicial es líquido, o 1 mL de la suspensión inicial en el caso de otros productos. Para ello, distribuya por duplicado 1 mL del inóculo en la superficie de una placa de Petri grande (140 mm) o en la superficie de tres placas pequeñas (90 mm), utilizando un asa de Hockey o Digrafsky estéril. Este método permite una detección más precisa, especialmente en situaciones donde se requiere una mayor sensibilidad.

Con cuidado, extienda el inóculo sobre la superficie de la placa de agar tan rápidamente como sea posible, evitando el contacto del asa con los lados de la caja. Posteriormente, deje las placas tapadas durante aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente para permitir que el inóculo se absorba en el agar.

| | | |
|---|--|--|
|  | Procedimiento para la determinación de presuntos <i>Bacillus cereus</i> en alimentos por el método de recuento en placa AOXLAB S.A. S | Identificación: PROC-TC-023 |
| | | Revisión: 4 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-10-22 |

Luego, invierta las placas preparadas e incúbelas durante 18 a 24 horas en una incubadora ajustada a 30°C ± 1°C.

4.6.3 Recuento de UFC y Cálculos

Después del periodo de incubación, seleccionar placas, preferiblemente en dos diluciones sucesivas, que contengan menos de 150 colonias.

Realice el conteo de las colonias presuntivas de *B. cereus* en cada placa y exprese el resultado multiplicando el resultado del conteo previo por 10 y el inverso de la dilución (ver ecuación 1).

Las colonias de *B. cereus* suelen ser grandes y rosadas, lo que indica que no se ha producido la fermentación del manitol, y suelen estar rodeadas por una zona de precipitación, lo que sugiere la producción de lecitinasa (consulte la nota 3 para más detalles). Si hay menos de 15 colonias características en placas inoculadas con el producto líquido o la dilución más baja para otros productos, es posible realizar un recuento estimado

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

Ecuación 1: Expresión de los resultados para recuentos en placa de *B. cereus* spp

Si se distribuyó un inóculo de 1 mL en tres placas, trate estas placas como una sola en todos los procedimientos de recuento y confirmación posteriores.


Si las placas de agar correspondientes a la muestra de prueba (productos líquidos) o la suspensión inicial (otros productos) no contienen colonias presuntivas de *B. cereus*, se puede reportar el resultado de la siguiente manera:

- <10 UFC/mL para productos líquidos que se analizan directamente.
- <100 UFC/g o mL para otros productos que se reconstituyen.

NOTA: Si las placas contienen numerosos microorganismos fermentadores de manitol que conducen a la producción de ácido, entonces el color rosado característico de las colonias de *B. cereus* puede reducirse o desaparecer por completo. De manera similar, algunas cepas de *B. cereus* producen poca o ninguna lecitinasa por lo que las colonias de estas cepas no estarán rodeadas por una zona de precipitación. Estas colonias también deberán someterse a pruebas de confirmación.

4.6.4 Pruebas de Confirmación

Seleccione cinco colonias presuntivas de cada placa seleccionada. Si hay menos de cinco colonias en la placa, tome todas las colonias presuntivas presentes. Si las placas están saturadas y no es posible

| | | |
|---|--|--|
|  | Procedimiento para la determinación de presuntos <i>Bacillus cereus</i> en alimentos por el método de recuento en placa AOXLAB S.A. S | Identificación: PROC-TC-023 |
| | | Revisión: 4 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-10-22 |

seleccionar colonias bien aisladas, siembre cinco colonias presuntivas en placas del agar MYP e incube las placas en una incubadora a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. durante 18 a 24 horas. Posteriormente, seleccione al menos una colonia bien aislada de color rosa de cada placa y confirme su identidad como se describe a continuación:

4.6.5 Prueba de hemólisis en agar sangre de cordero


Inocule las colonias seleccionadas en la superficie del agar sangre de cordero mediante agotamiento, punción o estriado, e incube a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 2\text{h}$ de manera que permita una adecuada interpretación de la reacción de hemólisis. La confirmación de *Bacillus cereus* se basa en su capacidad para producir hemolisinas, lo que resulta en una reacción positiva de hemólisis. Esta reacción debe ser observada como una zona grisácea clara alrededor de las colonias, indicando la lisis de los glóbulos rojos.

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

4.6.6 Pruebas confirmatorias complementarias

Opcionalmente, se pueden realizar una serie de pruebas confirmatorias, especificadas a continuación, para garantizar que las especies aisladas pertenecen a *Bacillus cereus* y diferenciarlas de otras especies bacterianas filogenéticamente relacionadas.

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 anaeróticamente 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) etilendiamina*). 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.

| | | |
|---|--|--|
|  | Procedimiento para la determinación de presuntos <i>Bacillus cereus</i> en alimentos por el método de recuento en placa AOXLAB S.A. S | Identificación: PROC-TC-023 |
| | | Revisión: 4 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-10-22 |

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.

4.7 Aseguramiento de la calidad

Para asegurar y controlar la validez de los resultados, por cada lote nuevo del agar se debe realizar una prueba ecométrica, adicional por cada lote interno de agra preparado se debe realizar un control positivo con Suspensión de *Bacillus cereus* ATCC 10876 y un control negativo usando suspensión de *Escherichia coli* ATCC 25922, se debe realizar un control positivo a una muestra adicionada con Suspensión de *Bacillus cereus* ATCC 10876 cada semana en una matriz diferente. Así mismo, para cada lote de agar o caldo preparado se debe realizar control de esterilidad poniéndolos a incubar sin inocular, también se puede realizar como control negativo o blanco una siembra por superficie del caldo empleado en el agar a usar.

5 RESPONSABILIDADES.

Director técnico

- Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.
- Aprobar los informes técnicos una vez han sido revisados por el Líder de Laboratorio.
- Asesorar y orientar los analistas en la resolución de dudas e inconvenientes surgidos durante el desarrollo de los ensayos.
- Realizar o revisar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método y autorizar las indicaciones a seguir.
- Establecer los casos en los cuales se realiza la retención de muestras.


Director de calidad

- Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.
- Realizar y registrar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método.
- Archivar los registros técnicos relacionados con los ensayos.

Líder de laboratorio

- Asegurar la aplicación del presente documento por el personal subordinado o supervisado.
- Revisar los resultados obtenidos del aseguramiento de calidad del método.
- Revisar los resultados ingresados por el analista, haciendo seguimiento de la trazabilidad del análisis.

Analista

| | | |
|---|---|--|
|  | <p align="center"> Procedimiento para la determinación de presuntos <i>Bacillus cereus</i> en alimentos por el método de recuento en placa AOXLAB S.A. S </p> | Identificación: PROC-TC-023 |
| | | Revisión: 4 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-10-22 |

- Revisar los resultados obtenidos del aseguramiento de calidad del método.
- Digitar los resultados de los ensayos en la plataforma para el reporte de resultados.
- Aplicar el presente documento.
- Seguir todas las instrucciones establecidas en este procedimiento y en el reglamento del laboratorio.
- Ingresar y entregar todos los resultados en los tiempos pactados.
- Entregar formatos de datos primarios completamente diligenciados al líder del laboratorio.
- Realizar revisión de datos primarios y cálculos realizados en los cuadros de mandos, informar al líder del laboratorio en caso de observar alguna desviación en los resultados obtenidos teniendo en cuenta las cartas control.
- Registrar los resultados de los ensayos de control de calidad y hacer el análisis de tendencias de estos.
- Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica.
- Informar al líder de laboratorio las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.
- Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder del laboratorio.
- Informar cualquier incidente que suceda durante la realización del método.
- Revisar que los equipos usados en el desarrollo del método tengan mantenimiento, calibración y/o verificación vigente, de acuerdo con el programa de mantenimiento y calibración.

6 FORMATOS RELACIONADOS.

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

FOR-TC-075 "Formato para el registro de datos primarios de análisis microbiológicos"

SOFT-TC-027 V5 "Cuadro de mando para ensayos microbiológicos por recuento V5"

FOR-TC-045 "Formato para el registro de información y asignación de lote de las soluciones preparadas para uso en los ensayos"

7 ANEXOS.

No aplica.