



| | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
|  | Procedimiento para el recuento de <i>Clostridium perfringens</i> y <i>Clostridium</i> sulfito reductores AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-028 |
| | | Revisión: 2 |
| | | Inicio de vigencia: 2023-02-14 |

Procedimiento para el recuento de *Clostridium perfringens* y *clostridium* *sulfito- reductores*

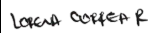


AOXLAB S.A.S.

| | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
|  | Procedimiento para el recuento de <i>Clostridium perfringens</i> y <i>Clostridium</i> sulfito reductores AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-028 |
| | | Revisión: 2 |
| | | Inicio de vigencia: 2023-02-14 |

DOCUMENTO CONTROLADO


PROC-TC-028 Recuento de *Clostridium perfringens* y *Clostridium* sulfito-reductores

Copia controlada No. : 1

| | Nombre | Puesto o función | Firma | Fecha |
|------------------------------------|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Elaboró: | Lorena Correa Restrepo | Líder de laboratorio |  | 2023-02-14 |
| Revisó: | Angela P. Patiño Pérez | Directora de calidad |  | 2023-02-14 |
| Aprobó: | Dario Pardo Pardo | Director técnico |  | 2023-02-14 |
| 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 | 2018-02-12 | 1 | Ninguno (versión original). | LVLS | NBR | YELP |
| Vigente | 2023-02-14 | 2 | Se cambia estilo según manual identidad | LCR | APPP | DPP |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

| | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
|  | Procedimiento para el recuento de <i>Clostridium perfringes</i> y <i>Clostridium</i> sulfito reductores AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-028 |
| | | Revisión: 2 |
| | | Inicio de vigencia: 2023-02-14 |

ÍNDICE

| Tabla de contenido | 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. | 5 |
| 3. REFERENCIAS. | 5 |
| 4. PATRONES DE MEDIDA. | 5 |
| 5. INSPECCIÓN VISUAL. | 5 |
| 5.1 Revisión general. | 5 |
| 5.2 Estabilización. | 6 |
| 5.3 Verificación de patrones y otros equipos. | 6 |
| 5.4 Manejo del ítem. | 6 |
| 5.5 Medidas de seguridad. | 7 |
| 6. INSTRUCCIONES DE ENSAYO. | 7 |
| 6.1 Preparación de reactivos | 7 |
| 6.2 Preparación de la muestra | 7 |
| 6.3 Procedimiento de ensayo | 7 |
| 6.4 Recuento y selección de colonias | 8 |
| 6.5 Confirmación | 8 |
| 6.6 Expresión de resultados | 8 |
| 6.6.1 Para las cajas que contienen menos de 150 colonias y al menos 15 | 8 |
| 6.6.2 Estimado de los números pequeños | 8 |
| 6.6.3 Sin colonias | 9 |
| 6.6.4 Calculo del recuento de colonias de <i>Clostridium perfringes</i> | 9 |
| 7. INFORME. | 10 |
| 8. RESPONSABILIDADES. | 10 |
| 8.1 Líder de Calidad. | 10 |
| 8.2 Líder de Laboratorio. | 10 |
| 8.3 Analistas. | 11 |
| 9. FORMATOS RELACIONADOS. | 11 |
| 10. ANEXOS. | 11 |

| | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
|  | Procedimiento para el recuento de <i>Clostridium perfringens</i> y <i>Clostridium</i> sulfito reductores AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-028 |
| | | Revisión: 2 |
| | | Inicio de vigencia: 2023-02-14 |

1. OBJETIVO Y ALCANCE.

1.1 Objetivo.

Describir el método para el recuento de *Clostridium perfringens* y *Clostridium sulfito-reductores* según la norma ISO 7937:2004 (NTC 4834/2000).

1.2 Alcance.

-Aplica para el personal técnico del Laboratorio.

-Este procedimiento es aplicable a los productos para consumo humano o animal, y las muestras ambientales en el área de la producción y manipulación de alimentos.

2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

2.1 Definiciones.

Calibración [3].

Operación que, bajo condiciones especificadas, en un primer paso, establece una relación entre los valores de las magnitudes con su incertidumbre de medición provista por patrones de medición y las indicaciones correspondientes con incertidumbres de medición asociadas y, en segundo paso, usa esta información para establecer una relación para obtener un resultado de medición de una indicación.

Documento [2].

Información y su medio de soporte.

Ensayo/prueba [2].

Determinación de una o más características de acuerdo con un procedimiento.

Procedimiento [2].

Forma especificada para llevar a cabo una actividad o un proceso.

Clostridium sulfito reductor [7].


Bacilo, gram(+), esporulado que tiene la propiedad de reducir el ión sulfito a sulfuro en presencia de sales de hierro dando colonias negras.

Clostridium perfringens [7].

Bacteria sulfito reductora que forma colonias características (rodeadas por un halo negro) en el medio selectivo especificado y que da reacciones de confirmación positiva cuando el ensayo se lleva a cabo siguiendo el método especificado en esta norma.

2.2 Notaciones.

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

| | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
|  | Procedimiento para el recuento de <i>Clostridium perfringes</i> y <i>Clostridium</i> sulfito reductores AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-028 |
| | | Revisión: 2 |
| | | Inicio de vigencia: 2023-02-14 |

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

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

“Ítem”: se refiere a los objetos o materiales bajo ensayo.

3. REFERENCIAS.

- [1] ISO/IEC 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories / Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
- [2] ISO 9000:2015 Quality management systems -- Fundamentals and vocabulary/ Sistemas de gestión de la calidad-- Fundamentos y vocabulario.
- [3] VIM: 2008, International vocabulary of metrology -- Basic and general concepts and associated terms.
- [4] ISO/IEC 17000:2004 Conformity assessment -- Vocabulary and general principles.
- [5] ISO/TR 10013:2001 Guidelines for quality management system documentation.
- [6] ISO 7937:2004 Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de *Clostridium perfringens*. Técnica del recuento de colonias (ISO 7937:2004, IDT).
- [7] NTC NTC 4834/2000. Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de *Clostridium* sulfito reductores e identificación de *Clostridium perfringes*. Técnica de recuento de colonias.

4. PATRONES DE MEDIDA.


Para realizar el ensayo se utilizan los siguientes patrones (o materiales) de referencia, equipos y componentes clave:

| Nombre | Marca | ATCC |
|-------------------------------|----------------|-------|
| <i>Clostridium Perfringes</i> | Microbiologist | 13121 |

5. INSPECCIÓN VISUAL.

5.1 Revisión general.

Al recibirse la muestra 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 para el recuento de <i>Clostridium perfringens</i> y <i>Clostridium</i> sulfito reductores AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-028 |
| | | Revisión: 2 |
| | | Inicio de vigencia: 2023-02-14 |

procedimiento PROC-TC-008 Procedimiento de aseguramiento de integridad de las muestras bajo servicio

5.2 Estabilización.

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

La balanza a usar en el ensayo se mantiene en el lugar de ensayo, y encendida (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.

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 con 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-008 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.

| | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
|  | Procedimiento para el recuento de <i>Clostridium perfringens</i> y <i>Clostridium</i> sulfito reductores AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-028 |
| | | Revisión: 2 |
| | | Inicio de vigencia: 2023-02-14 |

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 reactivos

Agar selectivo (SPS)

Composición:

| | |
|------------------------------------------|-------|
| Digestión enzimática de tejidos animales | 15,0g |
| Extracto de levadura | 10,0g |
| Citrato ferrico | 0,5g |
| Sulfito sódico | 1,0g |
| Polimixina- B- Sulfato | 0,02g |
| Neomisina sulfato | 0,05g |
| Agar | 13,6g |
| Agua | 1000g |

Se disuelven los componentes en agua por ebullición, se ajusta el pH de tal forma que después de la esterilización se 7_{-2}^{+} , se lleva a esterilizar a 121°C por 15 minutos.


Agar selectivo (SPS) listo para uso: Seguir las instrucciones del fabricante.

6.2 Preparación de la muestra:

La muestra se prepara de acuerdo con el PROC-TC-015 Procedimiento preparación de muestras,

6.3 Procedimiento de ensayo:

Usando una transferpipeta con puntas estériles, se transfiere 1 mL de la suspensión inicial o de la muestra de ensayo, si el producto inicial es líquido, en el centro de las cajas Petri vacías estériles; Se vierten de 10 a 15 ml de agar (numeral 6.1) mantenido en baño de agua en la caja, se mezcla bien con el inóculo girando suavemente la caja 5 veces en sentido de las manecillas del reloj, cinco veces en sentido contrario y cinco veces de abajo hacia arriba, cuando el medio se solidifique agregar 10 ml del mismo agar y se deja solidificar.

| | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
|  | Procedimiento para el recuento de <i>Clostridium perfringens</i> y <i>Clostridium</i> sulfito reductores AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-028 |
| | | Revisión: 2 |
| | | Inicio de vigencia: 2023-02-14 |

Se colocan las cajas invertidas en recipientes de anaerobiosis y se incuban a 35 ± 2 durante 24-72h. Se deben observar diariamente las cajas.

6.4 Recuento y selección de colonias.

Después del periodo de incubación especificado, se toman las cajas que tienen menos de 150 colonias y se realiza inmediatamente el recuento de colonias negras de *Clostridium sulfito reductores* en cada caja.

6.5 Confirmación:

- Se seleccionan tres a cinco colonias de cada caja de agar SPS guardadas para el recuento y se siembra en caldo tioglicolato.
- Se comprueba la pureza del cultivo haciendo frotis y coloración de Gram.
- Se incuba en baño de agua a $46 \pm 0,5$ °C durante 3 h.
- Luego se siembra por punción en pruebas bioquímicas.
- Se incuba a 35°C durante 24h; no es necesario incubar en anaerobiosis.

Pruebas bioquímicas: Ver PROC-TC-097 Pruebas bioquímicas para Microbiología.

Resultado que confirma presencia de *clostridium perfringens*

| | |
|-------------------------|---|
| Movilidad | - |
| Catalasa | - |
| Fermentación de lactosa | + |
| Reducción de nitrato | + |
| Licuefacción | + |


6.6 Expresión de resultados.

6.6.1 Para las cajas que contienen menos de 150 colonias y al menos 15.

Se calcula el N de *clostridium sulfito reductores* presentes en 1 ml o g de muestra usando la siguiente ecuación:

$$N = \frac{\sum a}{(n1 + 0,1n2)d}$$

Donde:

| | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
|  | Procedimiento para el recuento de <i>Clostridium perfringens</i> y <i>Clostridium</i> sulfito reductores AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-028 |
| | | Revisión: 2 |
| | | Inicio de vigencia: 2023-02-14 |

Σa : Es la suma de las colonias de *Clostridium sulfito reductores* contadas en todas las cajas de dos diluciones sucesivas, una de las cuales contiene al menos 15 colonias.

$n1$: Es el número de cajas guardadas en la primera dilución

$n2$: Es el número de cajas guardadas en la segunda dilución.

d : Es el factor de dilución correspondiente a la primera dilución retenida.

Los resultados se redondean a dos cifras significativas.

6.6.2 Estimado de los números pequeños:

Si las dos cajas correspondientes a la muestra e ensayo contienen menos de 15 colonias de *Clostridium sulfito reductores* se calcula el número estimado de N_E colonias en cada caja usando la siguiente ecuación:

Productos líquidos:

$$N_E = m$$

Otros productos:

$$N_E = m/d$$

En donde:

d : Es el factor de dilución de la suspensión inicial.

6.6.3 Sin colonias:


Si las dos cajas de la muestra de ensayo no contienen colonias de *clostridium sulfito reductores* el resultado se reporta:

-Menos de 1 *clostridium sulfito reductores* por mililitro (Productos líquidos)

-Menos de $1/d$ *clostridium sulfito reductores* por gramo (otros productos) en donde d es el factor de dilución de la suspensión inicial.

6.6.4 Calculo del recuento de colonias de *Clostridium perfringens*

Para cada caja de SPS agar se calcula el número N_a de de *Clostridium perfringens* en 1ml o 1g de producto, usando la siguiente ecuación:

| | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
|  | Procedimiento para el recuento de <i>Clostridium perfringens</i> y <i>Clostridium</i> sulfito reductores AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-028 |
| | | Revisión: 2 |
| | | Inicio de vigencia: 2023-02-14 |

$$a = \frac{b}{A} \times C$$

Donde:

b: es el número de colonias confirmadas como *C. perfringens*

A: es el número de colonias seleccionadas para confirmación

C: es el número de colonias típicas marcadas en la caja

El resultado se redondea a un número entero de colonias.

7. INFORME

Reportar los datos primarios en el FOR-TC-014 Formato para el almacenamiento de datos primarios y resultados de análisis microbiológicos y en el FOR-TC-015 "Formato para el control de tiempos y temperaturas de incubación"

Luego de tener los resultados estos se presentan conforme el formato FOR-TC-011 Formato de informe de ensayo.

La incertidumbre de las mediciones realizadas se determina conforme el procedimiento PROC-TC-002 Procedimiento de estimación de incertidumbres.

Se aplican los criterios de aceptación/rechazo según la normativa vigente para cada matriz y/o muestra a analizar.

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 Analista.

Aplicar el presente documento.

| | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
|  | <p>Procedimiento para el recuento de <i>Clostridium perfringens</i> y <i>Clostridium</i> sulfito reductores</p> <p>AOXLAB S.A.S</p> | <p>Identificación: PROC-TC-028</p> |
| | | <p>Revisión: 2</p> |
| | | <p>Inicio de vigencia: 2023-02-14</p> |

9. FORMATOS RELACIONADOS.

FOR-TC-011 "Formato de informe de ensayo".

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 para el almacenamiento de datos primarios y resultados de análisis microbiológicos"

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

10. ANEXOS.

No aplica