

# Procedimiento de recuento en placa para enterobacterias



AOXLAB S.A.S

CONFIDENCIAL

## DOCUMENTO CONTROLADO

### PROC-TC-030 Método de recuento en placa para enterobacterias


Copia controlada No. :1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
<b>Elaboró:</b>	Yeris M. Rinaldy Mojica	Analista de microbiología		2023-02-14
<b>Revisó:</b>	Angela P. Patiño Pérez	Directora de calidad		2023-02-14
<b>Aprobó:</b>	Dario Pardo Pardo	Director técnico		2023-02-14
<b>Localización del documento:</b>		<a href="http://107.190.139.42/~aoxlabsgc/sig/">http://107.190.139.42/~aoxlabsgc/sig/</a>		

### 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	2023-02-14	2	Se cambia estilo según manual identidad.	YMRM	APPP	DPP

ÍNDICE	
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.	4
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	6
6.3 Siembra por superficie o extensión	7
6.4 Siembra en profundidad	8
6.5 Recuento en Placa utilizando la metodología de Compact Dry TC	8
6.6 Método de uso del Compact Dry	9
6.7 Interpretación de Resultados con el Compact Dry	9
6.8 Recuento de UFC y Cálculos	10
7. INFORME.	10
8. RESPONSABILIDADES.	10
8.1 Líder de Calidad.	10
8.2 Líder de Laboratorio.	10
8.3 Analistas.	10
9. FORMATOS RELACIONADOS.	10
10. ANEXOS.	11

	<b>Procedimiento de recuento en placa para enterobacterias</b> AOXLAB S.A.S	<b>Identificación:</b> PROC-TC-030
		<b>Revisión:</b> 2
		<b>Inicio de vigencia:</b> 2023-02-14

## 1. OBJETIVO Y ALCANCE

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

**1.2 ALCANCE:** Aplica para el personal técnico del Laboratorio.

## 2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

### 2.1 Definiciones.

**Enterobacterias[1]:** Son bacterias Gram negativas con especies que pueden tener morfología de cocos o bacilos. Los miembros de este grupo forman parte de la microbiota del intestino (llamados coliformes) y de otros órganos del ser humano y de otras especies animales. Algunas especies pueden vivir en tierra, en plantas o en animales acuático. Con frecuencia se encuentran especies de enterobacterias en la industria alimentaria: para comprobar la sanidad de la fermentación de quesos y productos lácteos, alcoholes y en tratamientos médicos, como la producción de toxinas en el uso de cosméticos y fabricación de agentes antivirales de la industria farmacéutica.

**Incubadora [1]:** cámara aislada que permite que la temperatura se mantenga estable y uniformemente distribuida dentro del rango de error de temperatura máximo permisible especificado en el método de ensayo.

**Calibración [3]:** Proceso de comparar los valores obtenidos por un instrumento de medición con la medida correspondiente de un patrón de referencia (o estándar).

### 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. REFERENCIA

[1] NTC 5733. Microbiología de alimentos y productos de alimentación animal. Métodos horizontales para la detección y enumeración de enterobacterias. Parte 2: método de recuento de colonias.2009

[2] Association of Official Analytical Communities. Official Methods of Analysis .AOAC, Washington, D.C.

	<b>Procedimiento de recuento en placa para enterobacterias</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-030</b>
		<b>Revisión: 2</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-02-14</b>

#### 4. PATRONES DE MEDIDA.

Tubos de ensayo  
Cajas Petri con medio de cultivo  
Campanas de Durham  
Pipetas de 1 y 10 ml  
Gradillas  
Stomacher

Incubadora  
Cámara o cabina de Siembra  
Autoclave  
Asa y/o rastrillo microbiológico  
Material de vidrio necesario

- 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.

	<b>Procedimiento de recuento en placa para enterobacterias</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-030</b>
		<b>Revisión:</b> 2
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-02-14</b>

- 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"

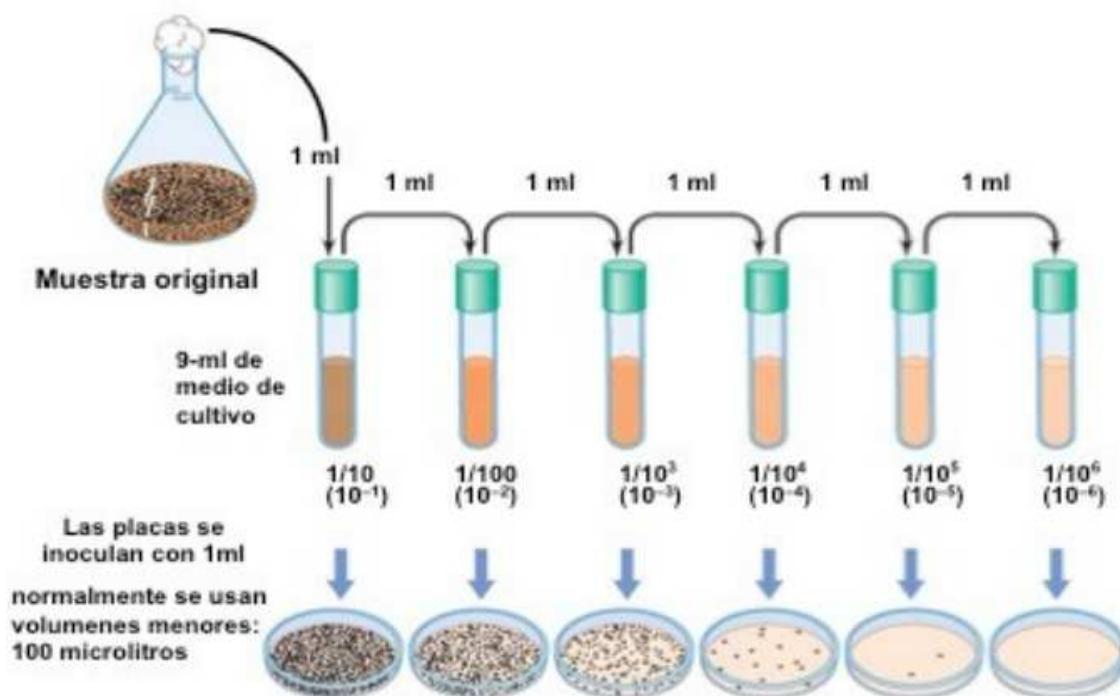
### 6. INSTRUCCIONES DE ENSAYO.

#### 6.1 Preparación de soluciones

Solución	Cantidad reactivo	Cantidad Solvente	Observaciones
Agar violeta rojo bilis glucosa	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

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  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante  $24 \pm 2$  h.




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 seis movimientos de derecha a izquierda, seis movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, seis movimientos en el sentido contrario al de las manecillas del reloj y seis 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. En cuanto el medio solidifique, agregar a cada caja, una sobrecapa de 4 ó 5 mL del mismo medio fundido y mantenido a  $45^{\circ}\text{C}$ , no permitir que se mojen las tapas de las cajas. La sobrecapa de agar se coloca para favorecer el crecimiento de los coliformes, que son facultativos. Dejar que solidifique.
6. Preparar una caja control con 18.0 a 20.0 mL de medio para verificar la esterilidad.
7. Solidificado el medio invertir las placas y colocarlas en la incubadora a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , durante  $24 \pm 2$  h.

#### 6.5 Recuento en Placa utilizando la metodología de Compact Dry

Compact Dry™ ETB contiene medios de cultivo deshidratados, un agente gelificante, sirve para detectar enterobacterias de forma rápida y sencilla. A través de sustratos específicos se detectan inequívocamente las enterobacterias.

	<b>Procedimiento de recuento en placa para enterobacterias</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-030</b>
		<b>Revisión:</b> 2
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-02-14</b>

El pH final 7,2+/- 0,4 a 25 ° C

## 6.6 Método de uso del Compact Dry


1. Retire el conjunto de cuatro bandejas de la bolsa de aluminio y separare cada cubeta individual doblando suavemente a lo largo del borde de conexión hasta que se libere cada bandeja. Alternativamente, si la creación de una serie de dilución de la misma muestra, las bandejas se pueden dejar conectados para facilitar la lectura de muestras similares. Bandejas que no se utilizan de inmediato deberán guardarse en la bolsa de aluminio.
2. Retire la tapa de la bandeja usando dos dedos para sujetar un extremo de la tapa y el pulgar para levantar el extremo opuesto. Las tapas son más fáciles de eliminar el uso de un método de "volver pelar" en contraposición a un método de "sacar".
3. Inocular con la pipeta 1 ml de la muestra directamente en el centro de una bandeja de pozo seco, teniendo cuidado de no tocar la superficie de la matriz con la punta de la pipeta. Una vez dispensado, la muestra se difundirá de forma automática a través de la superficie por la acción capilar para formar un gel; manual de propagación del inóculo se desanima. Recuerde para tener en cuenta el inóculo muestra el cálculo de la serie de dilución.
4. Vuelva a colocar la tapa y la etiqueta de la bandeja con la información apropiada, incluyendo el factor de dilución de la muestra.
5. Invertir la bandeja e incubar, al revés con el medio en la parte superior, a 35-37°C durante 24 horas.
6. Contar las colonias de iluminación desde la parte trasera de la bandeja para el cálculo de UFC/ml. Si el recuento de colonias es alta, utilizar la rejilla moldeada de 1 cm x 1 cm en la parte posterior de la bandeja para ayudar en el recuento de colonias. Use una hoja de papel blanco con líneas cuadradas para difundir la luz si las rejillas moldeadas en la bandeja son difíciles de visualizar con una caja de luz.

## 6.7 Interpretación de Resultados con el Compact Dry

Después de la incubación, leer bandejas sobre un fondo blanco.

Colonias de color rosa son indicativos de Enterobacterias

Contar todas las colonias de color rosa para obtener el recuento de Enterobacterias. El área de crecimiento es de 20 cm<sup>2</sup>. Si el recuento de colonias es alto, el recuento total se puede obtener multiplicando el número medio de colonias observadas en un 1 cm x 1 cm rejilla cuadrada de 20.

	<b>Procedimiento de recuento en placa para enterobacterias</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-030</b>
		<b>Revisión:</b> 2
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-02-14</b>

## 6.8 Recuento de UFC y Cálculos

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

- Contar las placas cuyo número de colonias esté comprendido entre 30 y 300.
- 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)

$$\text{UFC/g o ml} = \text{N}^\circ \text{ de colonias en placa (entre 30 y 300)} \times \text{inverso de la dilución} \times 10$$

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

## 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"

	Procedimiento de recuento en placa para enterobacterias AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-030
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

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

CONFIDENCIAL