


<b>aoxlab</b>	<b>Determinación de aerobios mesófilos por el método recuento en placa según USP</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-068</b>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-06-05</b>

# **Determinación de aerobios mesófilos por el método recuento en placa según USP**


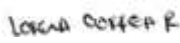

**AOXLAB S.A.S**

	<b>Determinación de aerobios mesófilos por el método recuento en placa según USP</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-068</b>
		<b>Revisión: 3</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-06-05</b>

## DOCUMENTO CONTROLADO


### PROC-TC-068 Determinación de aerobios mesófilos por el método recuento en placa según USP

Copia controlada No. :1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	Yeris Mercedes Rinaldy Mojica	Analista de microbiología		2023-06-01
Revisó:	Lorena Correa Restrepo	Líder de laboratorio		2023-06-05
Aprobó:	Darío Pardo Pardo	Director Técnico		2023-06-05
Localización del documento:		<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	2020/07/07	1	Ninguno (versión original).	YLCR/YMRM	DPP	YELP
Obsoleto	2021-10-01	2	Se organizaron condiciones ambientales, verificación de equipos, manejo de muestras, medidas de seguridad, se ajustó temperaturas de incubación, cambio de logo.	YLCR/YMRM	DPP	YELP
Vigente	2023-06-05	3	Se actualizan las referencias al bibliográficas de los documentos normativos	YMRM	DPP	YELP


	<b>Determinación de aerobios mesófilos por el método recuento en placa según USP</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-068</b>
		<b>Revisión: 3</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-06-05</b>

## ÍNDICE

1.	OBJETIVO Y ALCANCE.....	5
1.1	<b>Objetivo</b> .....	5
1.2	<b>Alcance</b> .....	5
2.	DEFINICIONES Y NOTACIONES.....	5
2.1	<b>Definiciones</b> .....	5
2.2	<b>Notaciones</b> .....	6
3.	REFERENCIAS.....	7
4.	DESARROLLO.....	8
4.1	Actividades previas.....	8
4.1.1	Inspección de la muestra.....	8
4.1.2	Estabilización.....	8
4.1.3	Verificación de equipos.....	9
4.1.4	Manejo de la muestra.....	9
4.1.5	Medidas de seguridad.....	9
4.2	Patrones y equipos de medición.....	9
4.3	Materiales y consumibles.....	10
4.4	Reactivos y/o soluciones.....	10
4.5	Instrucciones de ensayo.....	11
4.5.1	Preparación de soluciones de trabajo.....	11
4.5.2	Pretratamiento del material a examinar. [5].....	11
4.5.3	Materiales solubles en agua (Material vegetal).....	11
4.5.4	Materiales no grasos insolubles en agua (Cristales CBD).....	12
<b>4.5.5</b>	<b>Materiales grasos (Extractos oleosos)</b> .....	12
4.5.6	Preparación de la muestra:.....	12
4.5.7	Preparación de las diluciones seriadas para recuento en placa.....	12
4.5.8	Siembra por superficie o extensión.....	13
4.5.9	Siembra en profundidad.....	13
4.5.10	Recuento de UFC y Cálculos.....	14
4.5.11	Aseguramiento de la calidad.....	15
5.	RESPONSABILIDADES.....	15
5.1	Director técnico.....	15
5.2	Líder de Calidad.....	15

<b>aoxlab</b>	<b>Determinación de aerobios mesófilos por el método recuento en placa según USP</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-068</b>
		<b>Revisión: 3</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-06-05</b>

5.3	Líder de Laboratorio.....	15
5.4	Analista.....	16
6.	FORMATOS RELACIONADOS.....	17
7.	ANEXOS.....	17

	<b>Determinación de aerobios mesófilos por el método recuento en placa según USP</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-068</b>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-06-05</b>

## 1. OBJETIVO Y ALCANCE.

### 1.1 Objetivo.

Determinar el contenido de Unidades formadoras de colonia (UFC) de microorganismos aerobios mesófilos mediante la técnica de recuento en placa

### 1.2 Alcance.

Prueba o ensayo	Norma o método de referencia	Técnica o Método
Recuento de aerobios mesófilos	USP 43 <61> (2022) [5] Ph. Eur. 11.0, Chapter 2.6.12 (01/2023).[6]	Recuento en placa

Este método se aplica a las siguientes matrices de cannabis


- Material vegetal
- Cristales CBD
- Extractos oleosos

## 2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

### 2.1 Definiciones.

**Microorganismo [1]:** Entidad de tamaño microscópico, que incluye bacterias, hongos, protozoos y virus. **Nota:** para el propósito de esta parte de la norma, microorganismos son bacterias, levaduras y mohos capaces de formar colonias en el medio específico y en las condiciones de ensayo descritas en el procedimiento

**Microorganismos aerobios mesófilos [4]:** En este grupo se incluyen todos los microorganismos, capaces de desarrollar en presencia de oxígeno a una temperatura comprendida entre 20°C y 45°C con una óptima entre 30°C y 40°C. El recuento de microorganismos aerobios mesófilos, en condiciones establecidas, estima la microflora total sin especificar tipos de microorganismos. Refleja la calidad sanitaria de los productos analizados, indicando además de las condiciones higiénicas de la materia prima, la forma como fueron manipulados durante su elaboración

	<b>Determinación de aerobios mesófilos por el método recuento en placa según USP</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-068</b>
		<b>Revisión: 3</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-06-05</b>

**Análisis microbiológico [2]:** Procedimiento que se sigue para determinar la presencia, identificación, y cantidad de microorganismos patógenos e indicadores de contaminación en una muestra.

**Límites microbiológicos [2]:** Son los valores permisibles de microorganismos presentes en una muestra, que indican la aceptabilidad higiénico-sanitaria de una matriz

**Incubadora [2]:** 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.

	<b>Determinación de aerobios mesófilos por el método recuento en placa según USP</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-068</b>
		<b>Revisión: 3</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-06-05</b>

### 3. REFERENCIAS.

- [1] Instituto Colombiano de Normas Técnicas (2023). Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Técnica de recuento de colonias a 30 °C (Norma Técnica Colombiana NTC 4519:2009)
- [2] Instituto Colombiano de Normas Técnicas (2023). Microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. Requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos (Norma Técnica Colombiana NTC 4092:2009)
- [3] Centro Español de Metrología Vocabulario Internacional de Metrología Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados. 3ª edición en español
- [4] República Argentina - Administración Nacional de Medicamentos y Tecnología Médica – ANMAT. Análisis microbiológico de los alimentos metodología analítica oficial microorganismos indicadores volumen 3 Versión Noviembre de 2014
- [5] Farmacopea de los Estados Unidos de América (2022). Capítulo General, (61) Examen Microbiológico de Productos No Estériles: Pruebas de Recuento Microbiano. USP-NF. Rockville, MD: Farmacopea de los Estados Unidos de América.
- [6] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. (2023). European Pharmacopoeia (11th ed.). Council of Europe. Chapter 2.6.12.

	<b>Determinación de aerobios mesófilos por el método recuento en placa según USP</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-068</b>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-06-05</b>

#### 4. DESARROLLO.

##### 4.1 Actividades previas.

##### 4.1.1 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 herméticamente, y etiquetada con el sticker de identificación interna del laboratorio.

Se debe contar con al menos 10 gramos de muestra para realizar este análisis. Sin embargo, por disponibilidad de las muestras se puede trabajar desde 1 g. Estas muestras no requieren de refrigeración.

En caso de que la muestra no presente alguna de estas condiciones, informar de inmediato al líder comercial a través del Líder de laboratorio.

##### 4.1.2 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, e 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:

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.

	<b>Determinación de aerobios mesófilos por el método recuento en placa según USP</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-068</b>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-06-05</b>

#### 4.1.3 Verificación de 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 la balanza gramera de acuerdo con el procedimiento PROC-TC-005. Así mismo, se debe garantizar la desinfección de la cabina y encendiendo la fuente de luz UV durante por lo menos 30 minutos. Antes de cada ensayo, debe verificarse que se haya realizado la limpieza y desinfección de mesones e implementos a utilizar de acuerdo con el procedimiento PROC-TC-031 y la correcta limpieza y desinfección de los materiales, siguiendo las directrices establecidas en los procedimientos PROC-TC-026 y PROC-TC-027.

#### 4.1.4 Manejo de la muestra.

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 homogeneizada.

#### 4.1.5 Medidas de seguridad.

Se deben seguir las siguientes medidas de seguridad antes y durante la realización del servicio: Verificar que el sticker de calibración y mantenimiento de los equipos (Incubadoras, balanzas) se encuentren vigentes y no requiere alguna intervención. Inspeccionar que todos los reactivos preparados en el laboratorio al momento de realizar el ensayo y aquellos preparados anteriormente y que se encuentran almacenados, estén identificados con el formato FOR-TC-024 "Formato para rotular reactivos elaborados en el laboratorio". Verificar que ningún reactivo o preparación se encuentre vencido. En caso de que se encuentre alguna anomalía al respecto, avisar a la Dirección Técnica a través del Líder de Laboratorio.


Antes de realizar los ensayos, debe tenerse en cuenta que se debe seguir el procedimiento aquí descrito sin modificar ningún paso.

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

#### 4.2 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 entre 44° - 47°C

	<b>Determinación de aerobios mesófilos por el método recuento en placa según USP</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-068</b>
		<b>Revisión: 3</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-06-05</b>

- Cabina de bioseguridad
- Homogenizador de muestras (Stomacher)
- Dilucult (Equipo de pesaje y dilución de muestras)
- Incubadora entre 30-35 °C

#### 4.3 Materiales y consumibles

- Puntas para transfer pipeta de 1000 µL
- Puntas para transfer pipeta de 100 µL
- Bolsas whirl pack estériles con filtro
- Bolsas whirl pack estériles
- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Cajas de Petri plásticas estériles de 90 a 100 mm
- Asa y/o rastrillo microbiológico
- Probeta de 100 ml
- Cucharas, cuchillos, espátulas
- Alcohol 70 %
- Mechero

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


#### 4.4 Reactivos y/o soluciones

- Caldo digerido de caseína de soja
- Agua peptona
- Agar tripticasa de soya
- Tween 80<sup>®</sup> 5 g/L
- Tiosulfato de sodio 5 g/L

Preparados según PROC-TC- 206 “Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo”

- **Control positivo:** se puede usar una suspensión microbiana de alguno de los siguientes microorganismos: Suspensión bacteriana de *Escherichia coli* ATTC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 o *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 de aproximadamente 30-80 UFC.

Suspensiones preparadas según PROC-TC-207 “procedimiento para la preparación de suspensiones microbianas”

	<b>Determinación de aerobios mesófilos por el método recuento en placa según USP</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-068</b>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-06-05</b>

## 4.5 Instrucciones de ensayo

### 4.5.1 Preparación de soluciones de trabajo

- Agar tripticasa soja: la preparación se detalla en el PROC-TC-206 "Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo". Utilizando como cantidad de reactivo lo especificado por la casa comercial en el inserto y utilizando como diluyente agua destilada. Se prepara 15 mL a 20 mL por cada caja de Petri.
- Caldo digerido de caseína de soja con Tween 80 ®: la preparación se detalla en "Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo" PROC-TC-206. Utilizando como cantidad de reactivo lo especificado por la casa comercial en el inserto y utilizando como diluyente agua destilada y adicionando 5g de Tween 80: Se prepara en frascos de 1L.
- Agua peptona: la preparación se detalla en "Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo" PROC-TC-206. Utilizando como cantidad de reactivo lo especificado por la casa comercial en el inserto y utilizando como diluyente agua destilada. Se prepara en tubos de 9 mL y frascos de 1 L

El registro de la preparación de estas soluciones se diligencia en el FOR-TC 045

### 4.5.2 Pretratamiento del material a examinar. [5]


**Para material vegetal:** Pesar 10 g  $\pm$  0.5 g de la muestra en una bolsa *whirl pak* con filtro y adicionar 90 ml de caldo digerido de caseína de soja, esto corresponde a la dilución  $10^{-1}$ . Ver PROC-TC-199. Anotar los pesos correspondientes en el formato de registro de datos primarios FOR-TC-075. Llevar a homogenización en Stomacher durante 1 minuto.

**Nota:** en caso tal de que no se cuente con los 10 g de muestra se puede usar como mínimo 1 g, adicionando siempre de diluyente 9 ml por cada gramo pesado. Conservando siempre una dilución 1:10.

**Para muestras de cristales de CBD y/o extractos oleosos:** Pesar 1 g  $\pm$  0.05 g de la muestra en una bolsa *whirl paky* adicionar 9 ml de caldo digerido de caseína de soja que contiene tween 80®, esto corresponde a la dilución  $10^{-1}$ . anotar los pesos correspondientes en el formato de registro de datos primarios FOR-TC-075. Se realiza el procedimiento indicado para cada matriz de acuerdo con el 4.5.4 y 4.5.5

### 4.5.3 Materiales solubles en agua (Material vegetal)

Disuelva o diluya 10 g  $\pm$  0.5 g o 10 ml  $\pm$  0.5 ml de material, a menos que se especifique lo contrario en el procedimiento de prueba para el material en cuestión, en caldo digerido de caseína de soja con Tween 80 ® u otro medio adecuado que no tenga actividad antimicrobiana en las condiciones de la prueba, ajuste el volumen a 100 ml con el mismo medio. (Algunos materiales pueden requerir el uso de un volumen mayor). Se recomienda usar bolsas que contengan filtro para este tipo de muestra.

	<b>Determinación de aerobios mesófilos por el método recuento en placa según USP</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-068</b>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-06-05</b>

#### 4.5.4 Materiales no grasos insolubles en agua (Cristales CBD)

Suspenda 1 g o 1 ml de material, a menos que se especifique lo contrario en el procedimiento de prueba para el material en cuestión, en caldo digerido de caseína de soja Tween 80<sup>®</sup>: u otro medio adecuado que no tenga actividad antimicrobiana en las condiciones de la prueba; diluir a 10 ml con el mismo medio. (Algunos materiales pueden requerir el uso de un volumen mayor). Si es necesario, divida el material que se está examinando y homogeneice la suspensión mecánicamente.

#### 4.5.5 Materiales grasos (Extractos oleosos)

Homogeneizar 1 g o 1 ml de material, a menos que se especifique lo contrario en el procedimiento de prueba para el material en cuestión, añadir 9 mL de caldo digerido de caseína de soja Pre-calentado a 40 °C que contiene tween 80<sup>®</sup>. Mezcle y mantenga la temperatura en un baño de agua a 40 °C. Mantenga esta temperatura, si es necesario llevar hasta 45 °C durante el menor tiempo necesario hasta que se forme una emulsión y, en cualquier caso, durante no más de 30 minutos. Si es necesario se puede adicionar 3 gotas de Tween 80<sup>®</sup> para ayudar a disolver.

#### 4.5.6 Preparación de la muestra:


Dependiendo de la naturaleza del material (material vegetal, extractos oleosos, cristales de CBD) muela, disuelva, diluya, suspenda o emulsione el material que se está examinando, usando uno de los métodos que se describen a continuación y elimine cualquier propiedad antimicrobiana por dilución, neutralización o filtración.

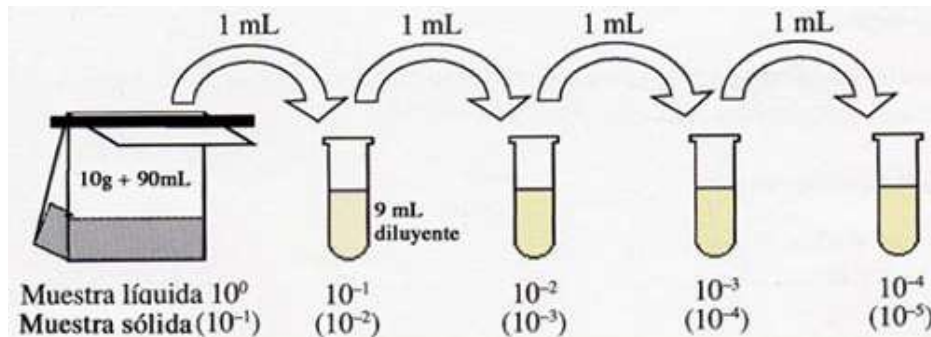
**NOTA:** Para facilitar el pipeteo de la muestra separe la mezcla líquida de los sólidos manualmente ajustando y presionando la bolsa *whirl pack* y por fuerza impulsora permitir que el líquido se transfiera o usar bolsas con filtro para facilitar la separación del caldo de dilución con la muestra.

Seguir las instrucciones según con el numeral 6.2.

#### 4.5.7 Preparación de las diluciones seriadas para recuento en placa

Las diluciones decimales seriadas se preparan siguiendo las instrucciones establecidas en el procedimiento PROC-TC-199, partiendo de la suspensión inicial (dilución 10<sup>-1</sup>). Deben prepararse tantas diluciones seriadas hasta obtener una que permita realizar un conteo entre 30 UFC y 300 UFC. En muestras que se sospeche puedan tener mucho crecimiento se recomienda hacer diluciones hasta 10<sup>-3</sup> o superior. Puede resultar útil revisar los resultados históricos reportados para muestras o matrices similares, con el propósito de establecer una guía para la preparación de la dilución apropiada.

	<b>Determinación de aerobios mesófilos por el método recuento en placa según USP</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-068</b>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-06-05</b>



Gráfica 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, tener en cuenta que lo puede hacer en siembra por superficie o siembra en profundidad.

#### 4.5.8 Siembra por superficie o extensión


Inocule 0.1ml de la muestra sobre el medio de cultivo ya solidificado y extienda con un asa o rastrillo microbiológico uniformemente sobre la superficie del agar. Lleve a incubación entre 30 °C y 35 ° C durante 48-72 horas.



Grafica 2: Siembra por superficie

#### 4.5.9 Siembra en profundidad

Inocular, 1.0 mL de la dilución correspondiente en cada caja, con pipeta estéril. Verter de 15.0 mL a 18 mL del medio de cultivo fundido, mantenido la temperatura a  $45 \pm 1.0^\circ\text{C}$  en baño de agua. El

	<b>Determinación de aerobios mesófilos por el método recuento en placa según USP</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-068</b>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-06-05</b>

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.

Mezclar cuidadosamente el inóculo con el medio, moviendo la caja cinco veces en forma horizontal, cinco veces en forma vertical, cinco veces haciendo ángulo recto, cinco veces en el sentido de las manecillas del reloj y cinco veces en sentido contrario a las manecillas del reloj. Permitir que la mezcla solidifique dejando las cajas Petri sobre una superficie horizontal fría. No permitir que se mojen las tapas de las cajas.

Preparar una caja control con 15.0 a 18 mL de medio para verificar la esterilidad y registrar el resultado en el formato FOR-TC-045

Una vez solidificado el medio, invertir las placas y colocarlas en la incubadora a 30 a 35°C durante 48-72 h.

#### 4.5.10 Recuento de UFC y Cálculos

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

- Tienen presentes todas las colonias presentes sin importar tamaño y forma.
- 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 del material de ensayo (NO en bacterias por gramo o mililitro)

**Siembra en superficie: UFC/g o ml = N° de colonias en placa x inverso de la dilución x 10**  
**Siembra en profundidad: UFC/g o ml = N° de colonias en placa x inverso de la dilución x 1**

Para el cálculo de la cantidad N de microorganismos presentes en la muestra de ensayo como un promedio ponderado a partir de dos diluciones sucesivas puede utilizarse la siguiente ecuación:

$$N = \frac{\sum c}{V \times 1.1 \times d}$$


En donde  $\sum c$  = es la suma de colonias contadas en las dos cajas conservadas proveniente de dos diluciones sucesivas por lo menos una de las cuales contiene un mínimo de 10 UFC,

V = es el volumen de inóculo puesto en cada caja en mililitros, d = es la dilución correspondiente a la primera dilución retenida o seleccionada

Si no hay UFC. en las cajas correspondiente a la dilución de mayor concentración, informar el recuento como menor de 1 multiplicando por el factor de dilución más concentrada.

**Ejemplo:** 10<sup>-1</sup>: Ausencia de UFC

Reporte el recuento como: menor de 10 UFC / g o mL, o menor de 1 X 10<sup>1</sup> UFC / g o mL.

	<b>Determinación de aerobios mesófilos por el método recuento en placa según USP</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-068</b>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-06-05</b>

Si ninguna de las placas tiene entre 30 y 300 UFC sino conteos superiores a 300 UFC las cajas se dividen en secciones radiales de 2, 4, 6 u 8 partes y se cuenta una o más secciones. Luego se promedia y se multiplica por el factor adecuado, con el fin de conseguir un número estimado de UFC presentes

**Ejemplo:** Dilución  $10^{-3}$  = 460 en  $\frac{1}{4}$  de la caja

$460 \times 4 = 1.840$  UFC       $1840 \times 1000 = 1840000$

Recuento estimado:  $18 \times 10^5$  UFC/g o mL

#### 4.5.11 Aseguramiento de la calidad

Para asegurar y controlar la validez de los resultados, se debe ensayar por cada matriz, una muestra por duplicado una vez a la semana. Así mismo, en cada lote de ensayo, se debe realizar control de esterilidad de los medios de cultivo y un control positivo usando una suspensión microbiana de alguno de los microorganismos mencionados en el numeral 4.4.

### 5. RESPONSABILIDADES.

#### 5.1 Director técnico.


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

#### 5.2 Líder 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.

#### 5.3 Líder de Laboratorio.


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

	<b>Determinación de aerobios mesófilos por el método recuento en placa según USP</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-068</b>
		<b>Revisión: 3</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-06-05</b>

- Revisar los resultados ingresados por el analista, haciendo seguimiento de la trazabilidad del análisis (Cuadros de mando, formato de solicitud de servicio y salvaguardia de muestras, formatos de datos primarios) antes de enviar el informe final al director técnico.
- Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica.
- Informar al director técnico las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.
- Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder de calidad y al director técnico.
- Informar los casos en los que se deben de retener las muestras.
- Supervisar el cumplimiento de las actividades de aseguramiento de calidad.

#### 5.4 Analista.

- 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.

	<b>Determinación de aerobios mesófilos por el método recuento en placa según USP</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-068</b>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2023-06-05</b>

## 6. FORMATOS RELACIONADOS.

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

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

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