


aoxlab	Determinación de mohos y levaduras por el método recuento en placa según USP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-204
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-06-03

Determinación de mohos y levaduras por el método recuento en placa según USP


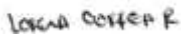

AOXLAB S.A.S


	Determinación de mohos y levaduras por el método recuento en placa según USP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-204
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-06-03

DOCUMENTO CONTROLADO

PROC-TC-204 Determinación de mohos y levaduras por el método recuento en placa según USP 43


Copia controlada No. :1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	Yeris M. Rinaldy Mojica	Analista de microbiología		2023-05-31
Revisó:	Lorena Correa Restrepo	Líder de laboratorio		2023-06-03
Aprobó:	Darío Pardo	Director técnico		2023-06-03
Localización del documento:		http://107.190.139.42/~aoxlabsgc/sig		

	Determinación de mohos y levaduras por el método recuento en placa según USP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-204
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-06-03


Control de Cambios

Estado	Fecha de Inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Obsoleto	2020-07-13	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
Obsoleto	2022-11-08	3	Se modifica el tiempo de exposición de las placas inoculadas con la cepa <i>Aspergillus brasiliensis</i> , indicado en el numeral 2.2 y el tiempo requerido en la desinfección de la cabina en el numeral 4.1.3	YMRM	APPP	DPP
Vigente	2023-06-03	4	Se modifica la referencia a los documentos normativos	YMRM	YLCR	DPP


	<p align="center">Determinación de mohos y levaduras por el método recuento en placa según USP</p> <p align="center">AOXLAB S.A.S</p>	Identificación: PROC-TC-204
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-06-03

1 ÍNDICE

1	ÍNDICE.....	4
1	OBJETIVO Y ALCANCE.....	6
1.1	Objetivo.....	6
1.2	Alcance.....	6
2	DEFINICIONES Y NOTACIONES.....	6
2.1	Definiciones.....	6
2.2	Notaciones.....	7
3	REFERENCIAS.....	8
4.	DESARROLLO.....	9
4.1	Actividades previas.....	9
4.1.1	Inspección de la muestra.....	9
4.1.2	Estabilización.....	9
4.1.3	Verificación de equipos.....	10
4.1.4	Manejo de la muestra.....	10
4.1.5	Medidas de seguridad.....	10
4.2	Patrones y equipos de medición.....	10
4.3	Materiales y consumibles.....	11
4.4	Reactivos y/o soluciones.....	11
4.5	Instrucciones de ensayo.....	13
4.5.1	Preparación de soluciones de trabajo.....	13
4.5.2	Pretratamiento del material a examinar. [5].....	13
4.5.3	Preparación de la muestra:.....	14
4.5.4	Preparación de las diluciones seriadas para recuento en placa.....	14
4.5.5	Siembra por superficie o extensión.....	15
4.5.6	Siembra en profundidad.....	15
4.5.7	Recuento de UFC.....	16
4.6	Expresión de resultados.....	17
4.7	Aseguramiento de la calidad.....	17
5	RESPONSABILIDADES.....	18
5.2	Director técnico.....	18
5.2	Director de Calidad.....	18

	Determinación de mohos y levaduras por el método recuento en placa según USP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-204
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-06-03

5.3	Líder de Laboratorio.....	18
5.4	Analista.....	18
6	FORMATOS RELACIONADOS.....	19
7	ANEXOS.....	19

	Determinación de mohos y levaduras por el método recuento en placa según USP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-204
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-06-03

1 OBJETIVO Y ALCANCE.

1.1 Objetivo.

Determinar el contenido de mohos y levaduras mediante la técnica de recuento en placa

1.2 Alcance.

Prueba o ensayo	Norma o método de referencia	Técnica o Método
Recuento de mohos y levaduras	USP NF, <61> Ph. Eur. 11.0, Chapter 2.6.12 (01/2023).	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

Mohos [3]: Microorganismos aerobios Mesófilos filamentosos que, crecen en la superficie del agar micológico, se desarrollan generalmente en forma plana o esponjosa.

Levaduras [2]:

Microorganismos aerobios Mesófilos que se desarrollan a 25°C usando un medio de agar micológico; desarrolla colonias redondas mate o brillante que crecen en la superficie del medio, que usualmente tienen un contorno regular y una superficie más o menos convexa. Poseen una morfología muy variable: esférica, ovoidea, piriforme, cilíndrica, triangular o, incluso, alargada en forma de micelio verdadero falso. Su tamaño supera al de las bacterias; al igual que los hongos, causan alteraciones de los productos alimenticios, especialmente los ácidos y presión osmótica elevada.

	Determinación de mohos y levaduras por el método recuento en placa según USP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-204
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-06-03

Recuento de mohos y levaduras viables: [2][4] Es la determinación del número de colonias típicas de levaduras y mohos que se desarrollan a partir de un gramo o centímetro cúbico de muestra, en un medio adecuado e incubado entre 22°C y 25°C.

Colonia [2]: Acumulación localizada visible de la masa microbiana desarrollada sobre o en un medio nutriente sólido a partir de una célula viable.

Análisis microbiológico [5]: Procedimiento que se sigue para determinar la presencia, identificación, y cantidad de microorganismos patógenos e indicadores de contaminación en una muestra.

Límites microbiológicos [5]: Son los valores permisibles de microorganismos presentes en una muestra, que indican la aceptabilidad higiénico-sanitaria de una superficie.

Incubadora [5]: 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 [6]: 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.

	Determinación de mohos y levaduras por el método recuento en placa según USP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-204
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-06-03

3 REFERENCIAS

- [1] International Organization for Standardization. (2023). General requirements for the competence of testing and calibration laboratories (ISO Standard No. 17025:2017).
- [2] Instituto Colombiano de Normas Técnicas (2023). Azúcar y productos azucarados. Determinación de mohos y levaduras. Método de recuento en placa. (Norma Técnica Colombiana NTC3954:2017).
- [3] Instituto Colombiano de Normas Técnicas (2023). Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la enumeración de mohos y levaduras. Parte 2: técnica de recuento de colonias en productos con actividad acuosa (a_w) superior a 0,95(Norma Técnica Colombiana NTC 5698-2:2009).
- [4] Instituto Colombiano de Normas Técnicas (2023). 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 (Norma Técnica Colombiana NTC4491-1: 2005).
- [5] 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 4092:2016).
- [6] Centro Español de Metrología Vocabulario Internacional de Metrología Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados.3ª edición en español
- [7] 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.
- [8] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. (2023). European Pharmacopoeia (11th ed.). Council of Europe. Chapter 2.6.12.

	Determinación de mohos y levaduras por el método recuento en placa según USP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-204
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-06-03

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.

	<p align="center">Determinación de mohos y levaduras por el método recuento en placa según USP</p> <p align="center">AOXLAB S.A.S</p>	Identificación: PROC-TC-204
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-06-03

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 60 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 XII.

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

	Determinación de mohos y levaduras por el método recuento en placa según USP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-204
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-06-03

- Transfer pipeta de 1000 µL
- Transfer pipeta de 100µL
- Baño de agua entre 44°C - 47°C (Muestras oleosas)
- Cabina de bioseguridad
- Incubadora entre 20°C - 25°C
- Homogeneizador de muestras (Stomacher)
- Dilucult (Equipo de pesaje y dilución de muestras)

4.3 Materiales y consumibles

- Puntas para transfer pipeta de 1000 µL
- Puntas para transfer pipeta de 100 µL
- Bolsas whirl pak estériles con filtro
- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Cajas de Petri plásticas estériles de 90 mm 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:


- Agua peptonada
- Caldo digerido de caseína de soja
- Agar sabouraud con cloranfenicol
- Tween 80[®]
- Tiosulfato de sodio

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

- **Control positivo:** Suspensión bacteriana de *Candida Albicans* ATCC 10231 de aproximadamente 10 - 80 UFC y suspensión bacteriana de *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 de aproximadamente 10-80 UFC
- **Control negativo:** Suspensión bacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 10-80 UFC

aoxlab	Determinación de mohos y levaduras por el método recuento en placa según USP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-204
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-06-03

Suspensiones preparadas según PROCT-TC-207 "procedimiento para la preparación de suspensiones microbianas"

	Determinación de mohos y levaduras por el método recuento en placa según USP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-204
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-06-03

4.5 Instrucciones de ensayo

4.5.1 Preparación de soluciones de trabajo

Solución	Cantidad reactivo	Cantidad Diluyente (Agua)	Observaciones
Agar Sabouraud con cloranfenicol 0,2%.	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.
Caldo digerido de caseína de soja con Tween 80 (5g/L) y tiosulfato de sodio (1g/L)	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar frascos de 1 litro

La preparación de estas soluciones de trabajo se detalla en el PROC-TC- 206 "Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo"

Registrar la preparación de estas soluciones 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 pak* y 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 numeral 6.2.2 y 6.2.3

4.5.2.1 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.

	Determinación de mohos y levaduras por el método recuento en placa según USP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-204
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-06-03

4.5.2.2 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[®]: 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.

4.5.2.3 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[®]. 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[®] para ayudar a disolver.

4.5.3 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.

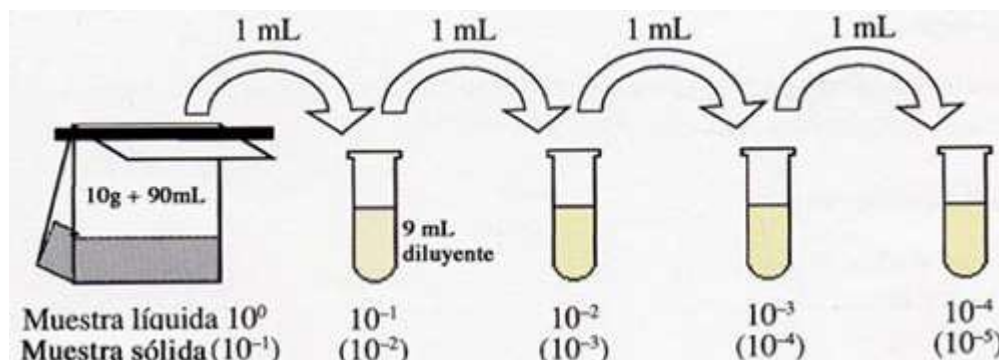
NOTA: Para facilitar el pipeteo de la muestra separe la mezcla líquida de los sólidos manualmente ajustando y presionando la bolsa *whirl pack* y por fuerza impulsora permitir que el líquido se transfiera o usar bolsas con filtro para facilitar la separación del caldo de dilución con la muestra.

Seguir las instrucciones según con el numeral 6.2.

4.5.4 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 10⁻¹). Deben prepararse tantas diluciones seriadas hasta obtener una que permita realizar un conteo entre 10 UFC y 150 UFC. En muestras que se sospeche puedan tener mucho crecimiento se recomienda hacer diluciones hasta 10⁻³ 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.

	Determinación de mohos y levaduras por el método recuento en placa según USP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-204
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-06-03



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

4.5.5 Siembra por superficie o extensión


Inocule 0.1 ml 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 a 20 a 25 °C durante 5 – 7 días (ver gráfico 2)



Gráfica 2: Siembra por superficie

4.5.6 Siembra en profundidad

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

	Determinación de mohos y levaduras por el método recuento en placa según USP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-204
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-06-03

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, la manera más indicada de mezclar el inóculo con el medio de cultivo es: mover 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 18.0 a 20.0 mL de medio para verificar la esterilidad y reportar en formato para el registro de información y asignación de lote de las soluciones preparadas para uso en los ensayos FOR-TC-045

Solidificado el medio invertir las placas y colocarlas en la incubadora a 20-25°C durante 5 -7 días

4.5.7 Recuento de UFC

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

Contar las placas cuyo número esté comprendido entre 10 y 150 colonias/propágulas/gérmenes. Si los mohos de crecimiento rápido son un problema, cuente las colonias/propágulas/gérmenes después de 2 días y nuevamente después de 5 a 7 días de incubación


Es preferible que los recuentos se hagan de cajas que contengan menos de 50 colonias/propágulas/gérmenes

Nota 1: los métodos de enumeración para levaduras y, en especial para lo mohos son imprecisos dado que consiste en una mezcla de micelio y esporas sexuales y asexuales. Las cantidades de unidades formadoras de colonias dependen del grado de fragmentación del micelio y de la proporción de esporas capaces de crecer en el medio de la placa

Nota 2: A menudo se presenta la no linealidad de los recuentos de las placas que contienen la dilución, es decir, las diluciones de 10 veces de la muestra con frecuencia no dan como resultado reducciones de 10 veces en los números de colonias recuperadas del medio en la placa. Esto se ha atribuido a la fragmentación del micelio y a la ruptura de los cúmulos de esporas durante la dilución además de la inhibición competitiva cuando hay un gran número de colonias sobre las placas

PRECAUCIÓN: las esporas de los mohos se dispersan en el aire con gran facilidad. Manipule las cajas de Petri con cuidado para evitar el desarrollo de colonias satélites que ocasionarían una sobreestimación de la población en la muestra.

Si es necesario, realice un examen con microscopio con el fin de diferenciar entre células de levaduras o de mohos y bacterias provenientes de las colonias

	Determinación de mohos y levaduras por el método recuento en placa según USP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-204
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-06-03

Cuente las colonias de levadura y las colonias/propágalas de mohos independientemente, si es necesario

Para la identificación de levaduras y mohos, seleccione ares de crecimiento de hongos y retírelas para un examen con microscopio o realice la inoculación en un medio adecuado de aislamiento o de identificación

4.6 Expresión de resultados

La cantidad de UFC obtenidas se debe multiplicar por el factor de dilución y el volumen inoculado. Expresar el resultado en UFC/g o mL del material de ensayo

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^{-1} : Ausencia de UFC

Reporte el recuento como: menor de 10 UFC / g o mL, o menor de 1×10^1 UFC / g o mL.

4.7 Aseguramiento de la calidad

Para asegurar y controlar la validez de los resultados, por cada lote de análisis, se debe ensayar por cada matriz, una muestra por duplicado una vez a la semana. Los resultados replicados deben registrarse en la herramienta SOFT-TC-027 Cuadro de mando para ensayos microbiológicos por recuento y realizar el análisis de las cartas control de acuerdo con el procedimiento PROC-TC-077 Procedimiento de elaboración de gráficos de control. Los resultados del análisis de tendencias deben mostrar que el proceso se encuentra bajo control estadístico.

Se debe realizar control de esterilidad de los medios de cultivo poniendo a incubar una placa sin inocular, realizar un blanco adicionando 1 ml de diluyente y realizar un control positivo con

	Determinación de mohos y levaduras por el método recuento en placa según USP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-204
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-06-03

Suspensión de *Candida albicans* ATTC 10231 y *Aspergillus Brasiliensis* ATCC 16404 y un control negativo usando suspensión de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

5 RESPONSABILIDADES.

5.2 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 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.

5.3 Líder de Laboratorio.

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

	Determinación de mohos y levaduras por el método recuento en placa según USP AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-204
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-06-03

- 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-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