


aoxlab	Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-206
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-11-27

Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo


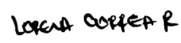
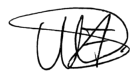
AOXLAB S.A.S

	Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-206
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-11-27

DOCUMENTO CONTROLADO


PROC-TC- 206 Preparación de soluciones y medios de cultivo

Copia controlada No. :1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	Duvan Torrado	Analista de microbiología		2023-11-27
Revisó:	Lorena Correa Restrepo	Líder de laboratorio		2023-11-27
Aprobó:	Laura Estefanía Guerra Foronda	Directora técnica		2023-11-27
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	2020-07-25	1	Ninguno (versión original).	YLCR/YMRM	DPP	YELP
Obsoleto	2021-12-09	2	Se realiza cambio de logo y se agrega la preparación de nuevos medios y soluciones adquiridas	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 4.1.1	YMRM	APPP	DPP
Vigente	2023-11-27	4	Se incluye la toma del pH antes del proceso de	DTG	YLCR	DPP

	<p>Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-206</p>
		<p>Revisión: 4</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2023-11-27</p>


			<p>esterilización y se modifica el tiempo máximo de almacenamiento de medios de cultivo solidificados. Se mejora redacción del documento.</p>			
--	--	--	---	--	--	--

Contenido


1. OBJETIVO Y ALCANCE.....6

	Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-206
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-11-27

1.1	Objetivo.....	6
1.2	Alcance.....	6
2.	DEFINICIONES Y NOTACIONES.....	6
2.1	Definiciones:.....	6
3.	REFERENCIAS.....	9
4.	DESARROLLO.....	10
4.1	Actividades previas.....	10
4.1.1	Inspección de los medios de cultivo y reactivos.....	10
4.1.2	Medios de cultivo y reactivos listos para usar.....	10
4.2	Preparación de los medios de cultivo.....	10
4.2.1	Generalidades.....	10
4.2.2	Agua.....	11
4.2.3	Pesaje y rehidratación.....	11
4.2.4	Disolución y dispersión.....	11
4.2.5	Medida y ajuste de pH.....	11
4.2.6	Vertido y distribución.....	12
4.2.7	Esterilización.....	12
4.2.8	Esterilización por calor húmedo.....	12
4.2.9	Monitoreo.....	12
4.2.10	Fusión de los medios de cultivo con agar.....	12
4.2.11	Desaireación de los medios.....	13
4.2.12	Adición de suplementos.....	13
4.2.13	Preparación y almacenamiento de los medios en cajas de Petri.....	13
4.2.14	Incubación.....	13
4.2.15	Inactivación de los medios de cultivo.....	13
4.3	Control calidad de los medios de cultivo.....	14
4.3.1	Evaluación física.....	14
4.3.2	Control de esterilidad.....	14
4.3.3	Medición de pH.....	14
4.3.4	Pruebas ecométricas a medios de cultivo.....	15
4.3.5	Composición básica de los medios de cultivo.....	15
•	Medidas de seguridad.....	16
•	Patrones y equipos de medición.....	16
•	Materiales y consumibles.....	16
•	Caldos y medios de cultivo.....	17

	<p>Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-206</p>
		<p>Revisión: 4</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2023-11-27</p>

- Suplementos 17
- Reactivos 17
- 5 Instrucciones de ensayo 19
- 5.1 Instrucciones para la preparación 19
- 5.1.2 composición y preparación de diferentes medios de cultivo y soluciones 20
- 6 Aseguramiento de la calidad 38
- 7 RESPONSABILIDADES 39
- Director técnico 39
- Director de Calidad 39
- Líder de Laboratorio 39
- Analista 39
- 8 FORMATOS RELACIONADOS 40
- 9 ANEXOS 40

	<p>Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-206</p>
		<p>Revisión: 4</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2023-11-27</p>

1. OBJETIVO Y ALCANCE.

1.1 Objetivo.

Brindar a través del siguiente instructivo las directrices necesarias para la preparación de los diferentes tipos de medios de cultivo y soluciones necesarias para los procedimientos analíticos en el laboratorio de microbiología

1.2 Alcance

Este método se aplica para la preparación de todos los medios de cultivo y soluciones requeridas

2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

2.1 Definiciones:

Lote de medio de cultivo [4]: unidad de un medio susceptible de investigación hasta sus orígenes, relacionada con una cantidad definida de producto en bruto, producto terminado o final, la cual tiene una clase y calidad homogénea y ha satisfecho los requisitos de producción (control del proceso) y los ensayos de aseguramiento de la calidad, se ha producido dentro de un período de producción definido y se le ha asignado el mismo número


Medio de cultivo [4]: fórmula de sustancias, en forma líquida, semisólida o sólida, formada por constituyentes naturales y/o sintéticos, diseñados para resistir la multiplicación o preservar la viabilidad de los microorganismos. NOTA Cuando este término se usa en relación con palabras compuestas, con frecuencia se expresa como "medio" (por ejemplo, medio enriquecido).

Medio de cultivo líquido [4]: medio de cultivo formado por una solución acuosa con uno o varios constituyentes (por ejemplo, agua peptonada, caldo nutritivo).

NOTA 1 En algunos casos se agregan partículas sólidas al medio de cultivo líquido.

NOTA 2 El medio líquido en tubos, frascos o botellas se conoce, frecuentemente, como "caldo".

Medios de cultivo sólidos: se preparan añadiendo un agar a un medio líquido (caldo) a razón de 15g/litro. El agar es una sustancia inerte polisacárida (hidrato de carbono) que se extrae de las algas. Como esta sustancia no es digerida por las bacterias no constituye ningún elemento nutritivo. Este conjunto convenientemente esterilizado puede ser vertido en placas de Petri o en tubos de ensayo

	Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-206
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-11-27

y presentan la posibilidad de aislar y diferenciar bacterias, "procesos que antes no eran posibles en medio líquido". c)


Medios de cultivo semisólidos: contienen 7,5 g de agar /litro de caldo. Se utilizan para determinar la motilidad de las especies en estudio. Actualmente se encuentran disponibles comercialmente con el agregado de agar.

Comunes o universales: su finalidad es el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos poco existentes. Es el medio más frecuentemente utilizado para mantener colonias microbianas. Por ejemplo: agar común o caldo común.

Enriquecidos: están compuestos de un medio base como apoyo del crecimiento al cual se le puede agregar un gran exceso de nutrientes como suplementos nutritivos, por ejemplo: sangre, suero, líquido ascítico, etc. Se utiliza para microorganismos que tienen grandes exigencias nutricionales.

Selectivos: son sólidos en los que la selectividad se consigue alterando las condiciones físicas del medio o añadiendo o suprimiendo componentes químicos específicos con el fin de inhibir el crecimiento de especies químicas cuyo crecimiento no interesa. Este tipo de medio sólo permite el crecimiento de un grupo de microorganismos e inhibiendo el de otros. Se utiliza para seleccionar y aislar microorganismos a partir de poblaciones mixtas. Por ejemplo, Agar salado-manitol o Chapman (permite el crecimiento de ciertos estafilococos).

Diferenciales: son medios de cultivos que nos permiten distinguir entre varios géneros y especies de microorganismos. Por ejemplo, si al medio se le ha añadido un carbohidrato y un indicador y la bacteria que se cultiva es capaz de fermentar dicho carbohidrato, se produce una acidificación del medio con el consiguiente viraje de color del indicador por el cambio de pH. El citrato de Simmons es un medio cuya única fuente de carbono es el citrato sódico, entonces en él solo crecerán las bacterias capaces de desarrollarse utilizando como única fuente de carbono ese componente. A menudo la separación se basa en la diferencia de color de las colonias aisladas, como en el agar con azul de metileno - eosina que permite diferenciar *E. coli* (colonias oscuras y de brillo metálico) de *Enterobacter aerogenes* (colonias rosadas de centro azul sin brillo). Estos dos microorganismos en agar nutritivo producen colonias de color gris blancuzco.

	<p>Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-206</p>
		<p>Revisión: 4</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2023-11-27</p>

De enriquecimiento: son medios líquidos que contienen un agente que inhibe las especies no deseadas pero que favorece el crecimiento irrestricto del agente infeccioso. El medio de Muller - Kauffman, permite el crecimiento de Salmonella inhibiendo a su vez el de numerosos coliformes. Esto es de gran importancia ya que, en ciertas muestras, por ejemplo, fecales, el agente infeccioso (Salmonella) es frágil y puede ser superado en número por agente bacterianos autóctonos como E. coli; por lo tanto, antes de realizar las pruebas de laboratorio es necesario aumentar su número con respecto a ésta en un caldo de enriquecimiento. Ejemplo de este tipo son los caldos de tetraciónato y selenito. El agua de peptona alcalina se utiliza para Vibrio cholerae. El enriquecimiento es una técnica que utiliza un medio selectivo líquido para permitir el desarrollo de un microorganismo a partir de una muestra que contiene una gran variedad de microorganismos. Así, aquellos microorganismos para los que el ambiente sea más favorable crecerán más que los otros y finalmente serán predominantes

De transporte: son utilizados para asegurar la viabilidad de la bacteria sin multiplicación significativa de los microorganismos desde el momento de su extracción hasta su posterior estudio. Se utilizan generalmente cuando las muestras deben ser enviadas de un laboratorio a otro.


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.

	<p>Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-206</p>
		<p>Revisión: 4</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2023-11-27</p>

3. REFERENCIAS


[1] NTC 4491-1: 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.

[2] NTC 4092:2009 Microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. Requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos-

[3]Vocabulario internacional de metrología: conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM). 1er edición en español, 2008

[4] **GTC 78: 2002** microbiología de alimentos y alimentos para animales. guía para la preparación y producción de medios de cultivo. guía general para el aseguramiento de la calidad para la preparación de los medios de cultivo en el laboratorio

[5] **ISO 11133:2014** Microbiología de los alimentos para consumo humano, alimentación animal y agua Preparación, producción, conservación y ensayos de rendimiento de los medios de cultivo

	<p>Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-206</p>
		<p>Revisión: 4</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2023-11-27</p>

4. DESARROLLO.

4.1 Actividades previas.

4.1.1 Inspección de los medios de cultivo y reactivos

Al recibirse los insumos en el Laboratorio, éstos son inspeccionados con el fin de verificar que se encuentren sellados; de igual manera, se revisa que los lotes y las fechas de vencimiento concuerden con los certificados de calidad entregados por el proveedor.

Antes de iniciar cada medio de cultivo o reactivo, se debe verificar que se encuentren sellados herméticamente, y etiquetados con el sticker de identificación interno del laboratorio, además, se deben marcar con la fecha de apertura y firma de la persona que lo destapa.

En caso de que los medios no presenten alguna de estas condiciones, informar de inmediato al líder del laboratorio para el respectivo proceso.

La limpieza y desinfección de la cabina de bioseguridad se realiza de acuerdo con el PROC-TC-031, adicionalmente debe desinfectar diariamente con alcohol al 70 % después de cada uso, en el caso de realizar proceso de detección molecular se realiza la desinfección con solución de hipoclorito de sodio al 3%.

Todos los días después de realizar proceso de desinfección con alcohol se debe encender la lámpara UV durante al menos 60 minutos.

4.1.2 Medios de cultivo y reactivos listos para usar

Se debe exigir al proveedor los certificados de calidad para los medios y reactivos que suministran. En este caso el laboratorio no está obligado a realizar ensayos de calidad, solo se debe asegurar las condiciones adecuadas de almacenamiento.


4.2 Preparación de los medios de cultivo

4.2.1 Generalidades

La preparación exacta del medio de cultivo es uno de los pasos fundamentales del examen microbiológico con el cual se recomienda especial cuidado.

Se respetarán las buenas prácticas de laboratorio y se seguirán las instrucciones del fabricante para el manejo de medios deshidratados y otros componentes, particularmente aquellos que contengan materiales peligrosos como, por ejemplo, sales biliares y otros agentes selectivos.

Cuando se prepare el medio con formulaciones comerciales deshidratadas se recomienda seguir las instrucciones del fabricante en forma precisa. Se recomienda documentar todos los datos relevantes como, por ejemplo, peso/volumen, pH, fecha de preparación, condiciones de esterilización, responsable.

	Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-206
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-11-27

4.2.2 Agua

Se recomienda usar agua destilada o agua de calidad equivalente, es decir, libre de sustancias que pudieran inhibir o influenciar el crecimiento de microorganismos en las condiciones del ensayo. Si el agua destilada se prepara con agua clorada, se recomienda neutralizar el cloro antes de destilarla. Se aconseja guardar el agua destilada en recipientes fabricados, preferiblemente, con materiales inertes (vidrio neutro, polietileno, etc.) y del cual se debe demostrar antes de su uso inicial, que está libre de cualquier sustancia inhibitoria

Para considerar que el agua destilada es de buena calidad, es aconsejable que esta tenga una resistividad no inferior a 300.000 Ω cm

Precaución. El agua procesada por intercambio de iones (desionizada) puede tener un alto contenido de microorganismos, por lo tanto, no es aconsejable usar esta agua sin verificar que el contenido de microorganismos en el agua sea bajo

4.2.3 Pesaje y rehidratación


Se pesa cuidadosamente la cantidad adecuada de medio deshidratado (teniendo cuidado de no inhalar el polvo, especialmente cuando el medio contiene sustancias toxicas) y se agrega progresivamente la cantidad necesaria de agua, evitando que se formen grumos

4.2.4 Disolución y dispersión

Se aconseja disolver el medio deshidratado rápidamente mezclando instantánea y repetidamente con calentamiento posterior, si fuera necesario. El medio que contiene agar se debe dejar hidratar antes de calentar y luego mezclar para disolverlo. Cuando el medio se prepare con componentes individuales, es aconsejable agregar cada componente por separado y dejar disolver antes de completar el volumen definitivo

4.2.5 Medida y ajuste de pH

En general los medios deben tener una variación de ± 0.2 unidades de pH después de la esterilización. Es necesario, medir el pH del medio con un pH-metro previamente calibrado y verificado antes de su uso. Los medios y las soluciones de referencia deben medirse a temperatura ambiente, ya que de lo contrario las lecturas serán imprecisas. Los medios comercialmente fabricados pueden mostrar cambios significativos de pH antes y después de la esterilización; sin embargo, si la calidad del agua utilizada en su preparación es la adecuada, los ajustes de pH antes de la esterilización no son necesarios. De cualquier modo, es necesario incluir la medición del pH tanto antes como después del proceso de esterilización y garantizar que se encuentre dentro de los límites establecidos por el proveedor.

	<p>Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-206</p>
		<p>Revisión: 4</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2023-11-27</p>

Normalmente, el ajuste se hace con una solución aproximadamente de 40g/l (cerca de 1 mol/L) de hidróxido de sodio (NaOH) o aproximadamente 36.5 g/l (cerca de 1 mol/L) de ácido clorhídrico (HCl)

4.2.6 Vertido y distribución

Envasar en tubos, frascos o matraces la cantidad necesaria del medio de cultivo limitando el volumen a las $\frac{3}{4}$ partes de la capacidad del recipiente. La distribución de los medios después de la esterilización debe realizarse bajo flujo de aire unidireccional para minimizar la posibilidad de contaminación ambiental. Esto debe considerarse como un requisito mínimo para los medios que se usan en ensayos de productos estériles, e incluye el enfriamiento de los medios, ya que las tapas de los envases necesitarán ser retiradas durante el enfriamiento para prevenir la condensación.

4.2.7 Esterilización

Se puede esterilizar el medio de cultivo y los reactivos por calor húmedo o por filtración. Para ciertos medios de cultivo no es necesario esterilizar en autoclave, sino que se pueden usar después de hervirlos. Por ejemplo, los medios para enterobacterias que contienen verde brillante son particularmente sensibles al calor y a la luz, por lo que es aconsejable enfriarlos rápidamente después de hervirlos y protegerlos de la luz fuerte. ver PROC-TC- 027

4.2.8 Esterilización por calor húmedo


Se hace en un autoclave o preparador de medios. La esterilización en la autoclave una vez alcanzados la presión y temperatura necesaria, demora, generalmente 15 minutos, cuando los volúmenes son superiores a 1000 mL se adapta el ciclo de esterilización como sea necesario. En todos los casos se recomienda seguir las instrucciones contenidas en la norma o las instrucciones del fabricante. Se recomienda monitorear el comportamiento de la autoclave para asegurar que se alcanza la temperatura deseada en condiciones típicas de carga. Se recomienda para tal fin el uso de cinta indicadora o termocuplas

4.2.9 Monitoreo

Después de esterilizar se recomienda monitorear todos los medios, en particular con respecto al pH, el color, la esterilidad y la consistencia

4.2.10 Fusión de los medios de cultivo con agar

Se funde un medio de cultivo situándolo en un baño de agua hirviendo o por cualquier otro procedimiento que dé resultados idénticos. Los medios que han sido previamente esterilizados en autoclave deberían ser recalentados durante un tiempo mínimo para mantener la calidad de los medios. Hay que evitar un calentamiento excesivo y retirarlo cuando este fundido. Se enfría el

	<p>Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-206</p>
		<p>Revisión: 4</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2023-11-27</p>

medio fundido a $47\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un baño de agua controlado termostáticamente hasta el momento de su empleo. El tiempo necesario para alcanzar los 47°C depende del tipo de medio, del volumen y del número de recipientes que haya en el baño de agua. Los medios de cultivo refundidos se deberían usar lo más pronto posible y se recomienda no conservarlos más de 4 h.

Nunca fundir el agar más de una vez

4.2.11 Desaireación de los medios

Si es necesario, justo antes de su uso, calentar el medio de cultivo en agua hirviendo o bajo vapor fluente durante 15 minutos con tapones flojos, después del calentamiento, se aprietan los tapones y se enfría rápidamente hasta la temperatura de utilización.

4.2.12 Adición de suplementos

Algunos medios requieren la adición de algún suplemento, por lo que se recomienda revisar que estos se encuentren en buen estado y que no superen su fecha de vencimiento. Se deben tener en cuenta las sugerencias del fabricante en caso de requerir alguna hidratación.

Los suplementos termolábiles se agregan al medio después de enfriarlo a $47\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, los suplementos estériles refrigerados se deben atemperar antes de adicionarlo al medio de cultivo para evitar que este se gelifique.

4.2.13 Preparación y almacenamiento de los medios en cajas de Petri

Se vierte el medio de cultivo en cajas de Petri previamente marcadas con el nombre y lote del medio de cultivo, hasta obtener un espesor no inferior a 2 mm, dejar enfriar y solidificar el agar colocando las cajas de Petri tapadas sobre una superficie horizontal fría.


Almacenar las cajas de Petri en refrigeración de 0 a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, preferiblemente en bolsas cerradas o en su defecto en papel vinipel, para evitar la desecación del agar. Se conservan hasta por dos meses, siempre y cuando se esté verificando las condiciones de estos.

4.2.14 Incubación

Se recomienda no apilar las cajas en filas de más de 6 unidades con el fin de que circule el aire y se equilibre la temperatura de incubación tan rápido como sea posible, cuando se incuba en jarras de anaerobiosis, tratar de que estén en su máxima capacidad o al menos más de 6 cajas. Las cajas siempre se deben incubar de forma invertida o sea con el agar hacia la parte superior.

4.2.15 Inactivación de los medios de cultivo

Se recomienda inactivar tanto los medios contaminados como los que no se hayan utilizado en forma segura, los medios que hayan pasado por una etapa de incubación o que no cumplan con

	<p>Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-206</p>
		<p>Revisión: 4</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2023-11-27</p>

criterio de esterilidad, realizando una etapa de descontaminación en autoclave eléctrica (código interno 157) a 121°C, 15 PSI durante mínimo 30 minutos. Después se depositan en una bolsa roja para recolección por parte de empresa especializada en este tipo de residuos peligrosos.

4.3 Control calidad de los medios de cultivo

4.3.1 Evaluación física


En cada lote de medio de cultivo preparado por el laboratorio, se deberá verificar en forma visual la apariencia y el color característico, en los caldos no debe haber turbiedad o material precipitado. En el caso de medios de cultivo con dextrosa, se debe tener en cuenta que el sobre calentamiento de los medios produce una reacción de Maillard, es decir oscurecimiento del medio por sobrecalentamiento. Los agares deben tener una consistencia firme, de color característico y no presentar agua de condensación. En general el volumen de medio de cultivo dosificado en placas Petri, debe ser de aproximadamente de 20 - 25 mL para evitar la rápida deshidratación del medio, favorecer su uso y cumplir con los requisitos del método de prueba. Los volúmenes de los medios líquidos que se utilicen para realizar diluciones de métodos cuantitativos deberán verificarse con una probeta.

4.3.2 Control de esterilidad

Por cada lote preparado se debe realizar un control de esterilidad. La cantidad de muestras a seleccionar para realizar las pruebas de control de calidad y evaluación de desempeño debe ser por lo menos el 5%, el cual consiste en incubar aproximadamente 1 a 3 cajas del medio plaqueado, para el caso de medios líquidos se incuban de 2 a 3 tubos por cada lote preparado de cada caldo. La incubación del medio se realiza a las condiciones de incubación que indique el método de prueba. Observar si los medios presentan algún signo de contaminación o cambio en su evaluación física. Cuando exista duda en la interpretación de contaminación, se deberán realizar resiembras a medios no selectivos como TSA, para descartar el desarrollo microbiano. Descartar el lote si está contaminado. El control de esterilidad se reporta en el formato FOR-TC-045.

4.3.3 Medición de pH

Determinar el pH de los medios de cultivo preparados con un pH-metro calibrado (antes y después del proceso de esterilización) y registrar los datos primarios en el FOR-TC-176. Los resultados deben estar dentro del intervalo indicado en el marbete del medio. Si no se cumple con esta determinación se debe ajustar con solución aproximadamente de 40g/l (cerca de 1 mol/L) de hidróxido de sodio (NaOH) o aproximadamente 36.5 g/l (cerca de 1 mol/L) de ácido clorhídrico (HCl).

	<p>Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-206</p>
		<p>Revisión: 4</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2023-11-27</p>

Realizar la medición del pH, cuando el medio de cultivo ha alcanzado la temperatura ambiente, idealmente a 20°C para evitar realizar la corrección por temperatura al valor medido del pH. Esta medición, junto con el valor medido de la temperatura se debe registrar en el FOR-TC- 176

4.3.4 Pruebas ecométricas a medios de cultivo

Se debe realizar las pruebas ecométricas de acuerdo con el "Procedimiento para pruebas ecométricas en medios de cultivo" PROC-TC-014, a todos los medios de cultivo nuevos, lotes nuevos y que superen la fecha de caducidad, este proceso se debe registrar en el FOR-TC-054

4.3.5 Composición básica de los medios de cultivo

PEPTONAS

- Digestión enzimática de caseína
- Digestión enzimática de frijol de soya
- Digestión enzimática de tejidos animales
- Digestión enzimática de la gelatina
- Digestión enzimática de tejidos de plantas y animales

EXTRACTOS


- Extracto de carne
- Extracto de cerebro corazón
- Extracto de levadura
- Bilis de buey para bacteriología
- Sales biliares

AGAR

- Agar bacteriológico

OTROS

- Emulsión de yema de huevo
- Leche en polvo descremada

	<p>Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-206</p>
		<p>Revisión: 4</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2023-11-27</p>

- Hidrolizado de caseína

- **Medidas de seguridad.**

Se deben seguir las siguientes medidas de seguridad antes y durante la realización de los medios: Verificar que el sticker de calibración y mantenimiento de los equipos se encuentre vigente (ubicados en el módulo 1 del laboratorio) y no requiere alguna intervención. Verificar que todos los reactivos se encuentren dentro de su vida útil, se debe tener precaución al momento del pesaje para evitar inhalación del polvo.


- **Patrones y equipos de medición.**

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

- Balanza analítica con resolución de 0.1 mg
- Autoclave automática
- Plancha de calentamiento con agitación
- Cabina flujo laminar
- Dispensador marienfield
- pH metro
- Baño serológico

- **Materiales y consumibles**
- Frascos schott con capacidad de 100, 250, 500 y 1000 ml
- Probeta de 1000 mL
- Probeta de 100 mL
- Tubos de ensayo
- Tapas roscas
- Papel aluminio
- Gradillas
- Cajas de Petri estériles 90 a 100 mm
- Cajas de Petri estériles 60 mm
- Agua destilada
- Cucharas, espátulas
- Cinta estereométrica
- Cinta de enmascarar
- Ampolla sterikon

Material debidamente lavado, secado y esterilizado (Ver PROC-TC 026-027)

	<p>Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-206</p>
		<p>Revisión: 4</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2023-11-27</p>

- **Caldos y medios de cultivo**

- Agar XLD
- Agar Hektoen
- Agar Plate Count
- Agar Baird Parker
- Agar Trypticase soya
- Agar Sabouraud
- Agar chromogenico E. coli
- Agar EMB
- Agar YGC
- Agar manitol salado
- Agar cetrimide
- Agar MRS
- Agar SPS
- Agar dicloran rosa de bengala
- Agar M17
- Agar Manitol yema de huevo polimixina (MYP)
- Agar mac conkey
- Agar bilis rojo violeta glucosa
- Agua Peptonada 1 %
- Agua peptonada tamponada
- Caldo mossel
- Caldo BRILLA
- Caldo RVS
- Caldo MRS
- Caldo BHI
- Caldo lauril sulfato
- Caldo letheen
- Caldo nutritivo
- Caldo demi fraser
- Caldo tripticase soja (CASO)
- Caldo Mac conkey
- Agua destilada

- **Suplementos**


- Solución yema huevo con telurito de potasio
- Suplemento caldo fraser
- Glicerol
- Tween 80®
- Suplemento para bacillus cereus (polimixina B)
- Solución de yema de huevo

- **Reactivos**

- Solución de cloruro férrico 10 %
- Solución de KOH al 40 %
- Solución de α -naftol 5 %

aoxlab	Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-206
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-11-27

- Hidróxido de sodio 1M
- Ácido clorhídrico 1M
- Cloruro de sodio
- Alcohol etílico absoluto
- Reactivo kovac's
- Tiosulfato de sodio

	<p>Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-206</p>
		<p>Revisión: 4</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2023-11-27</p>

5 Instrucciones de ensayo

5.1 Instrucciones para la preparación

- Revisar en cada tarro de medio de cultivo a preparar las instrucciones del fabricante, y realizar el cálculo adecuado de acuerdo con el volumen a preparar mediante una regla de tres.
- Colocar la bandeja sobre la balanza y tarar el peso. Con una cuchara tomar la cantidad de medio de acuerdo con el cálculo realizado.
- Depositar la cantidad pesada en un frasco schott de volumen adecuado, de acuerdo con la cantidad de a preparar de medio o solución.
- Medir el volumen de agua deseado en una probeta de 500 mL
- Depositar el agua en el frasco que contiene el medio deshidratado
- Se debe registrar la cantidad utilizada de medio, agua destilada o cualquier otro reactivo usado en el formato de preparación de soluciones **FOR-TC-045** para asignar el código interno, con los lotes usados de cada uno de los reactivos y la casa comercial.
- Se debe colocar un trozo de cinta estereométrica al frasco que contiene el medio con el nombre y lote interno del agar
- Introducir un magneto dentro del frasco
- Colocar el frasco con el medio en una plancha de calentamiento con agitación, encender la plancha a una temperatura de 250 – 300 °C, encender agitación entre 300 y 400 RPM y dejarlo hasta ebullición o de acuerdo con instrucciones del fabricante.

NOTA: No es recomendable trabajar temperaturas más altas de 300 °C ya que puede ocasionar el rompimiento del frasco

- Cuando se requiera realizar varios medios, se pueden colocar en el baño serológico a una temperatura de 95°C durante 1 hora y posteriormente llevar a plancha de calentamiento para terminar proceso de ebullición.
- Algunos diluyentes como agua peptona, agua tamponada, caldo letheen, caldo lauril, caldo BRILLA no requieren calentamiento. Pero en todos los casos se debe seguir las instrucciones de la casa comercial.
- Los medios de cultivo después de su proceso de preparación se deben llevar a esterilización en la autoclave automática a 121 °C por 15 minutos. Ver PROC-TC-027
- Algunos medios de cultivo no se pueden esterilizar, ver fichas técnicas de medios e instrucciones en cada recipiente de almacenamiento del medio. Para estos casos se debe esterilizar el agua destilada con el volumen requerido para la preparación de estos.
- Después del proceso de esterilización los medios que se requieran depositar en placas de Petri se deben llevar a un baño serológico a 45-50 °C para su enfriamiento.

aoxlab	Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-206
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-11-27

- Las cajas de Petri a utilizar se deben marcar con el nombre del medio y el lote interno y en cada una se deposita un volumen entre 15-20 mL en la base de la caja. Se dejan enfriar para su solidificación, se invierten y se llevan a la nevera de almacenamiento de medios a temperatura 0 - 8 °C. Para mejor conservación se aconseja guardar las cajas en bolsas plásticas o envueltas en papel vinylpel.
- Si los medios se van a conservar en el frasco, se dejan enfriar a temperatura ambiente hasta su solidificación y se llevan a la nevera de almacenamiento de medios a temperatura 0 - 8 °C
- Se debe realizar la medición del pH de cada medio o diluyente preparado y se debe registrar en formato de control de pH de medios de cultivo FOR-TC-176

5.1.2 composición y preparación de diferentes medios de cultivo y soluciones

- **Preparación de agar XLD (xilosa-lisina-desoxicolato)**

Para el aislamiento y diferenciación de Salmonella de alimentos y piensos, agua, cannabis y otros materiales.

COMPOSICIÓN

- | | |
|-----------------------------|--------|
| • D-Xilosa | 3,75 g |
| • L- Lisina | 5,0 g |
| • Lactosa | 7,5 g |
| • Sacarosa | 7,5 g |
| • Cloruro de Sodio | 5,0 g |
| • Extracto de Levadura | 3,0 g |
| • Rojo Fenol | 0,08 g |
| • Desoxicolato de Sodio | 1,0 g |
| • Tiosulfato de Sodio | 6,8 g |
| • Citrato Férrico de Amonio | 0,8 g |
| • Agar | 14,5 g |

Suspender 55 g de medio en un litro de agua destilada. Mezclar vigorosamente. Calentar con agitación suave hasta que el medio llegue a ebullición. Evitar el sobrecalentamiento ya que puede provocar la precipitación del medio. Este medio NO se puede esterilizar por autoclave. Enfriar a una temperatura entre 45-50°C en un baño de maría y verter en placas de Petri estériles.
pH 7.4 ± 0.2

- **Agar Hektoen**

Medio de cultivo selectivo y diferencial utilizado para el aislamiento de Salmonella spp. y Shigella spp. a partir de heces y alimentos

aoxlab	Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-206
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-11-27

COMPOSICIÓN

- Peptona 15,0 g
- Cloruro sódico 5,0 g
- Extracto de levadura 3,0 g
- Tiosulfato sódico 5,0 g
- Sales biliares 9,0 g
- Citrato férrico de amonio 1,5 g
- Lactosa 14,0 g
- Azul de bromotimol 0,065 g
- Sacarosa 14,0 g
- Fucsina ácida 0,1 g
- Salicina 2,0 g
- Agar 14,0 g

Disolver 75 g en 1 litro de agua destilada y dejar reposar durante 10 minutos. Calentar y llevar a ebullición unos pocos segundos para disolver el medio completamente. ¡No esterilizar en autoclave! Enfriar a una temperatura entre 45-50°C en un baño de maría y verter en placas de Petri estériles. pH: 7.5 ± 0.2

Agar plate count (estándar método)

- Es recomendado para el recuento de microorganismos mesófilos aerobios de muestras de alimentos y aguas.

COMPOSICIÓN

- Triptona 5.0 g
- Glucosa 1.0 g
- Extracto de levadura 2.5 g
- Agar – agar 15 g


Suspender 22.5 g en un litro de agua destilada o desionizada, mezclar bien, dejar en remojo por 15 minutos.

Calentar a ebullición, agitando permanentemente hasta completa disolución. Distribuir en forma conveniente y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos

Si es para verter en cajas de Petri se debe dejar enfriar a una temperatura entre 45-50°C en un baño de maría y se deposita de 15 a 20 mL en cada caja.

pH final: 7.0 ± 0.2

- **Agar baird Parker**

	<p>Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-206</p>
		<p>Revisión: 4</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2023-11-27</p>

Es un medio selectivo utilizado para el aislamiento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo.

COMPOSICIÓN

- Digestión Pancreática de Caseína 10.00 g
- Extracto de carne de buey 5.00 g
- Extracto de levadura 1.00 g
- Piruvato de sodio 10.00
- Glicina 12 g
- Clorito de Litio 5.00 g
- Agar 20.00 g

Pese 65.5 g del medio deshidratado y disuelva en 950 ml de agua destilada. Deje la mezcla en reposo durante 5 a 10 minutos aproximadamente.

Aplique calor removiendo el medio frecuentemente para mejorar el proceso de disolución. Deje hervir por un minuto.

Esterilice en el autoclave a 121°C por 15 minutos. Deje reposar hasta que alcance una temperatura de 45°C ± 2 °C y agregue 50 ml de la emulsión de yema de huevo + telurio. Mezcle bien y sirva entre 15 a 20 ml sobre placas de Petri estériles. Dejar solidificar, ordenar de forma invertida y guardar en nevera hasta su uso.

pH final: 7.2 ± 0.2

- **Agar tripticasa de soja**

El agar de tripton de soja, que es un medio de agar de uso general que contiene dos peptonas, facilita el crecimiento de los organismos aerobios y anaerobios. El crecimiento de estos últimos se realiza en cultivos profundos o por incubación en condiciones anaerobias. El agar de tripton de soja se recomienda como medio de referencia en pruebas de medios selectivos para medir el grado de inhibición.

COMPOSICIÓN

- Tripteína 15 g
- Peptona de soya 5 g
- Cloruro de sodio 5 g
- Agar-agar 14 g

Suspender 40 g en un litro de agua destilada. Calentar a ebullición, agitando permanentemente hasta completa disolución. Distribuir en forma conveniente y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos

Si es para verter en cajas de Petri se debe dejar enfriar a una temperatura entre 45-50°C en un baño de maría y se deposita de 15 a 20 mL en cada caja.

pH final: 7.3 ± 0.2

aoxlab	Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-206
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-11-27

- **Agar Sabouraud**

Este medio de cultivo es utilizado para cultivo de mohos y levaduras patógenas y no patógenas.

COMPOSICIÓN

- Digerido enzimático de caseína 10,0 g
- Glucosa 40,0 g
- Cloranfenicol 0.5 g
- Agar 15,0 g

Suspender 65 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta la disolución completa. Distribuir en recipientes adecuados y esterilizar en autoclave a 118-121 °C durante 15 minutos.

Si es para verter en cajas de Petri se debe dejar enfriar a una temperatura entre 45-50°C en un baño de maría y se deposita de 15 a 20 mL en cada caja.

pH final: 5.6 ± 0.2

- **Agar chromogenico, E.coli**

Es un medio de cultivo cromógeno diferencial para el análisis microbiológico de muestras de agua, alimentos, frotis. En un plazo de 24 horas este medio permite la detección, la diferenciación y la enumeración simultáneas de E. coli y bacterias coliformes.

COMPOSICIÓN

- Agar bacteriológico 10 g
- Peptona bacteriológica 3 g
- Mezcla cromogénica 0,36 g
- Cloruro sódico 5 g
- Piruvato sódico 1 g
- Sorbitol 1 g
- Tergitol® 15-S-7 surfactante 0,1 g
- Triptófano 1 g
- Buffer fosfato 4,9 g

Suspender 26,4 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver calentando con agitación frecuente. Hervir durante un minuto

hasta disolver por completo. EVITAR EL SOBRECALENTAMIENTO. NO AUTOCLAVAR. Dejar enfriar a 45-50 °C y dispensar en placas de Petri.

pH final: 6.8 ± 0.2

aoxlab	Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-206
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-11-27

- **Agar eosina azul de metileno (EMB)**

Este medio es utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales. Permite el desarrollo de todas las especies de la familia Enterobacteriaceae.

COMPOSICIÓN

- Peptona de carne 10.0 g
- Lactosa 10.0 g
- Hidrógenofosfato Dipotásico 2.0 g
- Eosina Amarillenta 0.4 g
- Azul de Metileno 0.067 g
- Agar – agar 13.5 g

Suspender 37.5 g en un litro de agua destilada, mezclar bien dejar en reposo por 15 minutos
Calentar a ebullición, con agitación permanente hasta completa disolución,
Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Dejar enfriar a 45-50°C, mezclar y distribuir en cajas de Petri estériles. Se debe dejar al menos 24 horas después de preparado para su uso. Almacenar en oscuridad, es sensible a la luz.

pH final: 6.8 ± 0.2

- **Agar YGC (Agar extracto de levadura-glucosa-cloranfenicol)**

Este medio de cultivo es utilizado para cultivo de mohos y levaduras en muestras de alimentos, ambientes, aguas, entre otros


COMPOSICIÓN

- Extracto de levadura 5,0 g
- Dextrosa 20,0 g
- Cloranfenicol 0.1 g
- Agar 15,0 g

Suspender 40.1 g del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta la disolución completa. Distribuir en recipientes adecuados y esterilizar en autoclave a 118-121 °C durante 15 minutos.

Si es para verter en cajas de Petri se debe dejar enfriar a una temperatura entre 45-50°C en un baño de maría y se deposita de 15 a 20 mL en cada caja.

pH final: 6.6 ± 0.2

	Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-206
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-11-27

- **Agar Manitol salado**

Medio de cultivo selectivo y diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos a partir de diversas muestras.

COMPOSICIÓN

- Peptona 10 g
- Extracto de carne 1 g
- Cloruro sódico 75 g
- Manitol 10 g
- Rojo fenol 0,025 g
- Agar 15 g

Añada 111 gramos de medio deshidratado en un litro de agua destilada estéril. Mezcle hasta que se obtenga una suspensión homogénea. Caliente suavemente, agitando con frecuencia y luego caliente hasta hervir y que se consiga la disolución completa. Esterilice en el autoclave a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar a 45-50°C, mezclar y distribuir en cajas de Petri estériles.

pH final: 7,4 ± 0.2

- **Agar cetrimida**

Medio utilizado para el aislamiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa* y de otras especies del género.

COMPOSICIÓN

- Peptona de gelatina 20,0 g
- Cloruro de magnesio 1,4 g
- Sulfato de potasio 10, g
- Agar 13,6 g
- Bromuro de cetrimetil amonio (cetrimide) 0,3 g

Pesar 43 gr del medio deshidratado y disolver en un litro de agua destilada. Agregar 10 ml de glicerol. Lleve la mezcla a una fuente de calor. Deje hervir por unos minutos hasta la disolución completa.


Autoclave a 121°C por 15 minutos. Deje reposar y sirva en placas de Petri estériles cuando la temperatura esté en 45-50°C aproximadamente.

Dejar solidificar y depositar en cajas estériles de 15 a 20 mL y guardar en nevera hasta su uso. Para sembrar las placas de agar cetrimida se deben sacar de la nevera con antelación y dejar que tome temperatura ambiente.

El pH final del medio debe quedar en 7,2 ± 0,2.

- **Agar MAN, ROGOSA Y SHARPE (MRS)**

Medio de cultivo apropiado para el aislamiento y recuento de lactobacilos y otras bacterias ácido-lácticas a partir de muestras clínicas y alimentos (especialmente productos lácteos).

	<p>Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-206</p>
		<p>Revisión: 4</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2023-11-27</p>

COMPOSICIÓN

- Peptona 10.0 g
- Extracto de carne 10.0 g
- Extracto de levadura 5.0 g
- Acetato de sodio 5.0 g
- Fosfato dipotásico 2.0 g
- Citrato de amonio 2.0 g
- Sulfato de magnesio 0.1 g
- Sulfato de manganeso 0.025 g
- Glucosa 20.0 g
- Tween 80 1 ml
- Agar – agar 1 3.0 g

Pesar 62 g y adicionar un litro de agua destilada, mezclar bien, dejar en remojo por 15 minutos, Calentar a ebullición con agitación permanente hasta disolución completa
Distribuir convenientemente, esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
Ajustar el pH a 6.2 ± 0.2

- **Agar sulfito polimixina sulfadiazina (SPS)**

El Agar SPS (Sulfito Polimixina Sulfadiazina) es un medio selectivo moderado para recuperar *Clostridium perfringens* de alimentos frescos o en conserva, e ingredientes alimentarios.

COMPOSICIÓN

- Triptona 15.0 g
- Extracto de levadura 10.0 g
- Citrato de hierro 0.5 g
- Agar – agar 15.0 g

Pesar 41 g y adicionar un litro de agua destilada o desionizada, mezclar bien, dejar en remojo 15 minutos, Calentar hasta ebullición con agitación permanente hasta disolución completa, se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.


Enfriar a 50–60 °C

Ajustar el pH a 7.0 ± 0.2

- **Agar rosa bengala**

El Agar Rosa de Bengala + Cloranfenicol es un medio neutral selectivo recomendado para la enumeración de hongos y levaduras en alimentos, agua y materiales ambientales

COMPOSICIÓN

	<p>Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-206</p>
		<p>Revisión: 4</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2023-11-27</p>

- Peptona 5,00 g
- Glucosa 10,00 g
- Sulfato de magnesio 0,50 g
- Fosfato potásico 1,00 g
- Rosa de Bengala 0,06 g
- Cloranfenicol 0,100 g
- Agar-agar 13,50 g

Disuelva 30.9 gramos del medio en un litro de agua purificada.

Caliente con agitación frecuente y hierva durante un minuto para disolver completamente el medio.

Autoclave a 121°C durante 15 minutos.

pH final: 7.2 ± 0.2

• **Agar M17**

Agar M17 es un medio nutricionalmente rico utilizado para el cultivo y la enumeración de estreptococos lácticos exigentes. Se recomienda para el aislamiento de *Streptococcus thermophilus* del yogur además de para crecer y mantener cultivos primarios para la fabricación de queso y yogur.

COMPOSICIÓN


- Triptona 5.0 g
- Peptona de caseína 2.5 g
- Peptona de soya 2.5 g
- Extracto de carne 5.0 g
- Extracto de levadura 2.5 g
- Lactosa 5.0 g
- Glicerofosfato de Sodio 19.0 g
- Sulfato de magnesio 0.25 g
- Ácido ascórbico 0.5 g
- Agar 11.0 g

Suspender 55 gramos de medio en 1 litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver calentando con agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta la disolver por completo. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

pH final: 7.2 ± 0.2 a 25 °C.

• **Agar manitol yema de huevo polimixina**

Agar selectivo y diferencial recomendado para el aislamiento y recuento de *Bacillus cereus* en muestras de alimentos y ambientales.

	Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-206
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-11-27

COMPOSICIÓN

- Extracto de carne 1 g
- Peptona 10 g
- Manitol 10 g
- Cloruro de Sodio 10 g
- Rojo de fenol 0,025 g
- Agar 15 g

Suspender 46 gramos de medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver por calentamiento agitando con frecuencia. Hervir durante un minuto hasta su completa disolución. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar a 45-50 °C y añadir asepticamente 100 ml de Emulsión de Yema de Huevo y 2 viales del Suplemento Bacillus Cereus reconstituidos en 5 ml de agua destilada estéril. Homogeneizar con cuidado y dispensar en placas.

pH: 7.2 ± 0.2

- **Agar mac conkey**

Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos a partir de muestras clínicas, aguas y alimentos. Todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae* desarrollan en el mismo.

COMPOSICIÓN

- Peptona de caseína 17.0 g
- Peptona de carne 3.0 g
- Lactosa 10.0 g
- Sales biliares 1.5 g
- Cloruro de sodio 5.0 g
- Rojo neutro 0.03 g
- Cristal violeta 0.001 g
- Agar – agar 13.5 g

Añadir 51,5 g en 1 litro de agua destilada, mezclar bien, dejar en remojo por 15 minutos

Calentar a ebullición, con agitación permanente hasta su disolución completa, se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Se deja enfriar hasta 45-50°C y se vierte en placas de Petri estériles, en volúmenes entre 15-20 ml.

pH final: 7,1±0,2

- **Agar bilis rojo violeta glucosa (VRBG)**

Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos a partir de muestras clínicas, aguas y alimentos. Todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae* desarrollan en el mismo.

aoxlab	Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-206
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-11-27

COMPOSICIÓN

- Peptona 7,0 g
- Extracto de levadura 3,0 g
- Glucosa 10,0 g
- Sales biliares N.º 3 1,5 g
- Cloruro sódico 5,0 g
- Rojo neutro 0,03 g
- Violeta cristal 0,002 g
- Agar 15,0 g

Disuelva 36.6 gramos del medio en un litro de agua purificada.

Caliente con agitación frecuente y hierva durante un minuto para disolver completamente el medio.

Autoclave a 121°C durante 15 minutos.

pH final: 7.4 ± 0.2

- **Agua peptona tamponada patógenos (*Salmonella, Listeria E.coli 0157:H7*)**

Se usa como diluyente o para el enriquecimiento no selectivo de microorganismos en muestras de comida y medioambientales.

COMPOSICIÓN

- Hidrolizado enzimático de caseína 10,0 g;
- Cloruro de sodio 5,0 g;
- Fosfato di hidrogenado de potasio 1,5 g;
- Hidrogenofosfato de sodio dodecahidrato 9,0 g

Vierta 25,5 g de polvo en 1,0 L de agua purificada. Mezcle bien. En caso de ser necesario, caliente la solución para disolver completamente el polvo. Dispense. Esterilice en autoclave a 121°C por 15 minutos.

El pH final es de 7,0 ± 0,2 a 25°C.

Agua peptona para análisis de indicadores y diluciones

Se usa como diluyente o para el enriquecimiento no selectivo de microorganismos en muestras de comida y medioambientales.

COMPOSICIÓN

- Hidrolizado enzimático de caseína 10,0 g;
- Cloruro de sodio 5,0 g;
- Fosfato di hidrogenado de potasio 1,5 g;
- Hidrogenofosfato de sodio dodecahidrato 9,0 g

aoxlab	Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-206
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-11-27

Vierta 2,5 g de polvo en 1,0 L de agua purificada. Mezcle bien. En caso de ser necesario, caliente la solución para disolver completamente el polvo. Dispense. Esterilice en autoclave a 121°C por 15 minutos.

El pH final es de $7,0 \pm 0,2$ a 25°C.

- **Caldo tripteína de soja (CASO)**

Medio de cultivo adecuado para el desarrollo de microorganismos exigentes, generalmente utilizado en el control de esterilidad de productos biológicos, farmacéuticos y cosméticos.

COMPOSICIÓN

- Digerido Papaínico de Soja 3,0 g
- D(+)-Glucosa 2,5 g
- Digerido Pancreático de Caseína 17,0 g
- di-Potasio Hidrógeno Fosfato 2,5 g
- Sodio Cloruro 5,0 g

Suspender 30 g en 1 l de agua destilada; mezclar bien y calentar ligeramente hasta disolución total. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos

pH: 7.3 ± 0.2

- **Caldo BRILLA**

Se utiliza para la detección de organismos coliformes en alimentos, productos lácteos, agua y aguas residuales, así como en otros materiales de importancia sanitaria.

COMPOSICIÓN

- Bilis de Buey Deshidratada 20,0 g
- Verde Brillante 0,0133 g
- Lactosa 10,0 g
- Peptona de Gelatina 10,0 g

Disolver 40 g en 1 l de agua destilada. Distribuir en tubos de ensayo con campana Durham en porciones de 9 ml cuando la muestra sea de 1 ml o menos. Si la muestra a analizar es mayor, se puede preparar un caldo más concentrado (doble o triple concentrado) y restablecer la concentración al añadir la muestra. En cualquier caso, esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

pH final: 7.4 ± 0.2

- **Caldo BHI**

El caldo BHI es un medio de cultivo altamente nutritivo que permite la recuperación de toda clase de microorganismos Gram positivos, Gram negativos, hongos y levaduras.

aoxlab	Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-206
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-11-27

COMPOSICIÓN

- Infusión de cerebro de ternera 200 g
- Infusión de corazón de vacuno 250 g
- Proteosa – peptona 10.0 g
- Cloruro de sodio 5.0 g
- Fosfato disódico 2.5 g
- Glucosa 2.0 g

Agregar 37 g en un litro de agua destilada, mezclar bien, dejar en remojo por 15 minutos Calentar si es necesario suavemente y agitar hasta completa disolución

Distribuir convenientemente y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos, su pH final es 7.4 ± 0.2

• Caldo mossel

Caldo EE Mossel (Enriquecimiento *Enterobacteriaceae*) es un caldo de enriquecimiento, que se utiliza para promover el crecimiento del grupo Enterobacteriaceae, microorganismos que contaminan los alimentos. La Farmacopea Europea, recomienda este medio para la prueba de bacterias Gramnegativas tolerantes a la bilis en productos.

COMPOSICIÓN

- Peptona 10.0 g
- Glucosa 5.0 g
- Fosfato disódico dihidratado 8.0 g
- Fosfato monopotásico 2.0 g
- Ox – gall 20.0 g
- Verde brillante (solución acuosa al 0.5%) 3.0 ml

Pesar 25,97 g para 1 litro de agua destilada, mezclar bien, dejar en remojo por 15 minutos. Calentar suavemente con agitación permanente hasta su disolución completa, distribuir convenientemente en recipientes estériles.

No es necesario esterilizar, pero el medio debe enfriarse rápidamente hasta temperatura ambiente.

pH final 7.2 ± 0.2

• Caldo MRS

Medio de cultivo apropiado para el enriquecimiento de lactobacilos y otras bacterias ácido-lácticas a partir de muestras clínicas y alimentos (especialmente productos lácteos).

COMPOSICIÓN

- di-Amonio Hidrógeno Citrato 2,0 g

aoxlab	Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-206
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-11-27

- Extracto de Carne 8,0 g
- Extracto de Levadura 4,0 g
- D (+)-Glucosa 20,0 g
- Magnesio Sulfato 0,2 g
- Manganeso(II) Sulfato 0,05 g
- Peptona Bacteriológica 10,0 g
- di-Potasio Hidrógeno Fosfato 2,0 g
- Sodio Acetato 5,0 g
- Tween 80 1,0 g

Suspender 52 g en 1 l de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición. Esterilizar a 121°C durante 12 minutos. Distribuir en placas de Petri estériles.

pH: 6,2±0,2

- **Caldo lauril sulfato**

Medio usado para detección y recuento de coliformes en aguas, aguas residuales y alimentos

COMPOSICIÓN

- Tripticasa, triptona o triptosa 20.0 g
- Lactosa 5.0 g
- Fosfato dipotásico 2.75 g
- Fosfato monopotásico 2.75 g
- Cloruro de sodio 5.0 g
- Lauril sulfato sódico 0.1 g

Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada, mezclar bien, dejar en remojo por 15 minutos, mezclar nuevamente. Distribuir en tubos tapa rosca volúmenes de 10 ml conteniendo tubos de fermentación invertidos de 75 X 10 mm. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 10 minutos; el pH final será de 6.8 ± 0,2 aproximadamente.

- **Caldo letheen**

Para el análisis microbiológico en cosmética.

COMPOSICIÓN

- Extracto de Carne 5,0 g
- Extracto de Levadura 2,0 g
- Lecitina 0,70 g
- Peptona de Caseína 5,0 g
- Peptona de Carne 20,0 g
- Glucosa 1,0 g

aoxlab	Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-206
		Revisión: 4
		Inicio de vigencia: 2023-11-27

Medio utilizado para enriquecimiento selectivo de especies de Salmonella spp. a partir de alimentos, medicamentos y otros materiales de importancia sanitaria.

COMPOSICIÓN

- Magnesio Cloruro anhidro (Heptahidrato 40,0 g) 18,73 g
- Peptona de Soja 5,0 g
- Potasio di-Hidrógeno Fosfato 1,40 g
- di-Potasio Hidrógeno Fosfato 0,20 g
- Sodio Cloruro 8,0 g
- Verde de Malaquita 0,04

Disolver 26,8 g en 1 l de agua destilada. Distribuir y esterilizar a 115°C durante 15 minutos. No sobrecalentar. El medio conservado en la nevera puede presentar precipitados, ello no influye en sus características selectivas.

pH 5.2 ± 0.2

- **Caldo Demi fraser**

Medio usado para el enriquecimiento selectivo de especies de Listeria, entre ellas, Listeria monocytogenes


COMPOSICIÓN

- Cloruro de sodio 20 g
- Fosfato de sodio, dibásico 9,6 g
- Peptona-caseína 5 g
- Peptona de carne 5 g
- Extracto de carne 5 g
- Extracto de levaduras 5 g
- Cloruro de litio 3 g
- Fosfato de potasio, monobásico 1,35 g
- Esculina 1 g
- Acriflavina 0,0125 g
- Ácido nalidíxico 0,01 g

Suspenda 55 g del polvo en 1 L de agua purificada. Mezcle bien. Esterilice en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Enfríe a temperatura ambiente

Suplemento: Se requiere el 3M Suplemento para Caldo Fraser (5% de citrato de amonio férrico, REF: BP0220010) para el enriquecimiento diferencial de *Listeria*. Si se requiere la incorporación del 3M Suplemento para Caldo Fraser, enfríe la base de caldo a temperatura ambiente y agregue asepticamente 10 ml del 3M Suplemento para Caldo Fraser. Mezcle bien.

pH final 7,2 ± 0,2 a 25 °C

	<p>Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-206</p>
		<p>Revisión: 4</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2023-11-27</p>

- **Solución de yema de huevo**
Se usa como suplemento para el agar manitol yema de huevo polimixina

COMPOSICIÓN

- Huevo 1 unidad
- Cloruro de sodio 0.68 g
- Agua destilada 80 mL

Se disuelven el cloruro de sodio en el agua destilada y se lleva a esterilización a 121 °C por 15 minutos. El huevo se debe lavar con jabón neutro, y se deposita en un recipiente que contenga alcohol al 70 % durante aproximadamente 2 horas, de modo que quede sumergido totalmente en este. Se hace un pequeño orificio para descartar la clara y la yema se deposita en la solución de cloruro de sodio previamente esterilizada.

- **Caldo BHI con glicerol 30%**

Este caldo se usa como agente crioprotector para la conservación de cepas ATCC almacenadas en el ultracongelador.

COMPOSICIÓN

- Caldo BHI 2,06 g
- Glicerol 24 mL
- Agua destilada 56 mL


Se mezclan los ingredientes y se lleva a esterilización a 121 °C durante 15 minutos

- **Solución de cloruro férrico al 10%**
Se usa para la confirmación de prueba de Triptófano desaminasa (TDA) en kit de identificación bioquímica API 20E. Prueba del metabolismo de los compuestos nitrogenados, que pone de manifiesto si el microorganismo posee la enzima triptófano desaminasa.

COMPOSICIÓN

- Cloruro férrico 10 g
- Agua destilada

Se pesan 10 g de cloruro férrico, se depositan en un balón volumétrico de 100 mL y se afora con agua destilada estéril hasta completar volumen de 100 mL

	<p>Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-206</p>
		<p>Revisión: 4</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2023-11-27</p>

- **Solución de KOH 40%**
Se usa para la confirmación de prueba de Voges Proskauer en kit de identificación bioquímica API 20E. se usa para observar si el microorganismo problema utiliza la glucosa por la vía butilén-glicólica originará un compuesto que es la acetoína.

COMPOSICIÓN

- Hidróxido de potasio 40 g
- Agua destilada

Se pesan 40 g de hidróxido de potasio, se disuelven en 50 mL de agua destilada estéril y se mantiene en un baño de agua fría ya que puede liberar calor, cuando se enfríe se lleva a un balón volumétrico de 100 mL y se afora con agua destilada estéril hasta completar volumen

- **Solución de α -naftol 5%**
Se usa para la confirmación de prueba de Voges Proskauer en kit de identificación bioquímica API 20E. se usa para observar si el microorganismo problema utiliza la glucosa por la vía butilén-glicólica originará un compuesto que es la acetoína.

COMPOSICIÓN

- α -naftol 5 g
- alcohol etílico absoluto

Se pesan 5 g de α -naftol, se disuelven en 50 mL de alcohol etílico absoluto, se lleva a un balón volumétrico de 100 mL y se afora con alcohol etílico absoluto hasta completar volumen


- **Solución salina 0.85%**
- Cloruro de sodio 8.5 g
- Agua destilada 1000 mL

- **Caldo CASO con tween 80®**

se utiliza para determinar la eficacia de la desinfección de contenedores, superficies, cosméticos de agua, etc. y otros productos de importancia sanitaria. También se puede utilizar para la detección y enumeración de microorganismos a partir de productos insolubles en agua y productos grasos que contienen conservantes o antimicrobianos.

COMPOSICIÓN

- Caldo CASO 30 g
- Agua destilada 1000 mL
- Tween 80® 5 mL

	<p>Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-206</p>
		<p>Revisión: 4</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2023-11-27</p>

- **Hidróxido de sodio (NaOH) 1 M**

Se usa para el ajuste de pH en la preparación de medios de cultivo

COMPOSICIÓN

- NaOH 40 g
- Agua destilada 1000 mL

Se pesa 40 g de NaOH y se completa el volumen a 1 litro con agua destilada previamente esterilizada

Acido clorhidrico (HCl) 1 M

Se usa para el ajuste de pH en la preparación de medios de cultivo

COMPOSICIÓN

- HCl 36,5 g
- Agua destilada 1000 mL

Se pesa 36,5 g de HCl y se completa el volumen a 1 litro con agua destilada previamente esterilizada

Tiosulfato de sodio 0.1 N

Se usa como agente neutralizante o agente decolorante que neutraliza todos los residuos halógenos. Se usa para la adición a muestras de agua en frascos de vidrio

COMPOSICIÓN

- Tiosulfato de sodio 2,5 g
- Agua destilada 100 mL

Se pesa la cantidad dada de tiosulfato y se ajusta a volumen de 100 mL, se lleva a esterilización a 121 °C por 15 minutos. Se debe adicionar 0.1 mL por cada 100 mL de muestra de agua.


Tiosulfato de sodio 5 %

Se usa como agente neutralizante o agente decolorante que neutraliza todos los residuos halógenos. Es usada para la neutralización de desinfectantes en pruebas de poder bactericida

COMPOSICIÓN

- Tiosulfato de sodio 5 g
- Agua destilada 1000 mL

Se pesa la cantidad dada de tiosulfato y se ajusta a volumen de 100 mL, se lleva a esterilización a 121 °C por 15 minutos

	<p>Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-206</p>
		<p>Revisión: 4</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2023-11-27</p>

Almacenamiento de los medios de cultivo preparados en el laboratorio

Los medios de cultivo y soluciones preparadas deben almacenarse refrigerados (0°C-8°C), protegidos de la Luz o desecación (bolsas celofán o plástico). Evaluación Vida Útil: rendimiento físico, químico y microbiológico. Recomendación: 3 a 8 semanas placas y máximo 3 meses para tubos y botellas selladas.

6 Aseguramiento de la calidad

• Control de esterilidad de los medios preparados

Este procedimiento se realiza cada vez que se esteriliza un lote de medio de cultivo o diluyente en autoclave de acuerdo con el PROC-TC-027. Se debe reportar en el **FOR-TC-045** el resultado de control de esterilidad del medio de cultivo preparado. Consiste en incubar por lo menos el 5% de la cantidad del material preparado, aproximadamente 1 a 3 cajas del medio plaqueado, para el caso de medios líquidos se incuban de 2 a 3 tubos por cada lote preparado de cada caldo.

• Control con ampolla Sterikon® plus Bioindicador


- Ampollas de caldo nutritivo y esporas de un organismo no patógeno, *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953
- La resistencia térmica es tal que las esporas mueren totalmente después de 15 min a una T:121 °± 0,5 °C (15 PSI/1 bar).
- Después de autoclavar, se procede a revisar el proceso de esterilización por incubación a 60°C ± 2 °C a 24h. de las ampollas. Si no hay crecimiento de *Geobacillus stearothermophilus* indica que la esterilización fue adecuada, cuando se muestra crecimiento la esterilización fue inadecuada. Este proceso se debe realizar cada 15 días y se debe registrar el cumplimiento en el formato de verificaciones intermedias **FOR-TC-005**.

• Control con cinta estereométrica

Se debe colocar cinta estereométrica a los diferentes medios o utensilios que se les realice el proceso de esterilización.

Las cintas indicadoras de esterilización se utilizan para asegurar envases, paquetes y diferentes envoltorios para la esterilización. Se encuentran impresas con un indicador químico de gran desempeño y muestran un cambio de color definido una vez expuestos a las condiciones adecuadas de esterilización. De esta forma indican al operador que el material ha sido procesado, disponibles para los procesos de esterilización.

El cumplimiento de cambio de color de la cinta en cada ciclo de esterilización se debe reportar en el formato de funcionamiento de la autoclave **FOR-TC-177**

	<p>Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-206</p>
		<p>Revisión: 4</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2023-11-27</p>


7 RESPONSABILIDADES.

- *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.

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

- *Líder de Laboratorio.*
 - Asegurar la aplicación del presente documento por el personal subordinado o supervisado.
 - Revisar los resultados 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.

- *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.

	<p>Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-206</p>
		<p>Revisión: 4</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2023-11-27</p>

- 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.

8 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"

FOR-TC-176 "Formato para el registro de pH de medios de cultivo"

FOR-TC-005 "Formato de verificaciones intermedias"

9 ANEXOS.