


aoxlab	PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES MICROBIANAS AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-207
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2021-12-10

PROC-TC-207 PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES MICROBIANAS

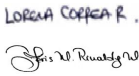
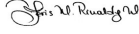


AOXLAB S.A.S

	PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES MICROBIANAS AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-207
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2021-12-10

DOCUMENTO CONTROLADO

PROC-TC-207 Procedimiento para la preparación de suspensiones microbianas

Copia controlada No. :1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	Yesica Lorena Correa Restrepo Yeris Mercedes Rinaldy Mojica	Analista de microbiología	 	2021-12-10
Revisó:	Darío Pardo Pardo	Líder de calidad		2021-12-13
Aprobó:	Yasmin Eliana Lopera Pérez	Gerente		2021-12-15
Localización documento:	del	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	2020-11-22	1	Ninguno (versión original).	YLCR/YMR M	DPP	YELP
Vigente	2021-12-15	2	Se realiza actualización de procedimiento y cambio de logo, se incluye proceso de trazabilidad.	YLCR	DPP	YELP


ÍNDICE

1. OBJETIVO Y ALCANCE.

4

	<p style="text-align: center;">PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES MICROBIANAS</p> <p style="text-align: center;">AOXLAB S.A.S</p>	Identificación: PROC-TC-207
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2021-12-10

1.1. Objetivo	4
1.2. Alcance	4
2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.	4
2.1. Definiciones.	4
2.2. Notaciones.	5
3. REFERENCIAS.	6
4. DESARROLLO.	7
4.1. Medidas de seguridad	7
4.2. Manejo de cepas de reserva y de trabajo	7
4.3. Patrones y equipos de medición.	7
4.4. Materiales y consumibles	8
5. Reactivos y/o soluciones	8
5.1. Preparación de la suspensión inicial	9
5.2. Cálculo de volumen a adicionar para métodos cualitativos	11
5.3. Cálculo de volumen a adicionar para métodos cuantitativos	12
5.4. Preparación de las diluciones seriadas para recuento en placa	12
6. Aseguramiento de la calidad	13
7. RESPONSABILIDADES.	13
7.1. Director técnico.	13
7.2. Líder de Calidad.	13
7.3. Líder de Laboratorio.	13
7.4. Analista.	13
8. FORMATOS RELACIONADOS.	14
9. ANEXOS.	14

	<p style="text-align: center;">PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES MICROBIANAS</p> <p style="text-align: center;">AOXLAB S.A.S</p>	Identificación: PROC-TC-207
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2021-12-10

1. OBJETIVO Y ALCANCE.

1.1. Objetivo

Brindar las directrices generales para la preparación de las suspensiones microbianas utilizadas para pruebas ecométricas, de promoción de crecimiento y en los controles positivos y negativos usados en los diferentes análisis microbiológicos realizados por el laboratorio

1.2. Alcance

Prueba o ensayo	Norma o método de referencia	Técnica o Método
Preparación de suspensiones microbianas	ISO 11133:2014	N.A

Las suspensiones realizadas se usan para ensayos de promoción de crecimiento en los medios de cultivo, verificar que no haya inhibiciones en las diferentes matrices evaluadas en el laboratorio de los microorganismos a detectar, en los ensayos de verificación y validación de métodos, en controles positivos y negativos.


2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

2.1. Definiciones.

Cepas de reserva [5]: cepas idénticas obtenidas mediante un único subcultivo de una cepa de referencia suministrada por el proveedor, o que proceden directamente del proveedor como tales.

Cepas de trabajo [5]: subcultivos primarios obtenidos de una cepa de reserva.

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

	<p style="text-align: center;">PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES MICROBIANAS</p> <p style="text-align: center;">AOXLAB S.A.S</p>	Identificación: PROC-TC-207
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2021-12-10

Diluciones decimales adicionales [4]: Suspensiones o soluciones obtenidas mezclando un volumen medido de la suspensión inicial con un volumen de nueve veces de diluyente y repitiendo esta operación con diluciones adicionales, hasta obtener una serie de diluciones decimales, adecuadas para la inoculación en el medio de cultivo.

Homogenizado [4]: Resultado del proceso de mezclar el producto, hasta observarse uniforme, en una sola fase.

Dilución [4]: Resultado del proceso de mezclar una sustancia con un líquido hasta que se incorporan.

Análisis microbiológico [1]: Procedimiento que se sigue para determinar la presencia, identificación, y cantidad de microorganismos patógenos e indicadores de contaminación en una muestra.

Límites microbiológicos [1]: Son los valores permisibles de microorganismos presentes en una muestra, que indican la aceptabilidad higiénico-sanitaria de una superficie.

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

Calibración [2]: 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.

	<p style="text-align: center;">PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES MICROBIANAS</p> <p style="text-align: center;">AOXLAB S.A.S</p>	Identificación: PROC-TC-207
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2021-12-10

3. REFERENCIAS.

- [1] NTC 4092:2009 Microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. Requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos-
- [2] Vocabulario internacional de metrología: conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM). 1er edición en español, 2008
- [3] Análisis microbiológico de los alimentos metodología analítica oficial microorganismos indicadores volumen 3
- [4] Informe técnico sobre cepas de trabajo en el laboratorio de análisis microbiológico, Comisión de Normalización y Validación (CNV), Sociedad española de microbiología, primera edición, noviembre 2006
- [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 style="text-align: center;">PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES MICROBIANAS</p> <p style="text-align: center;">AOXLAB S.A.S</p>	Identificación: PROC-TC-207
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2021-12-10

4. DESARROLLO.

4.1. Medidas de seguridad

Debido a que en la realización de las suspensiones microbianas se trabaja con cepas de diferentes microorganismos patógenos se deben tener todas las medidas de seguridad pertinentes como lo son trabajar dentro de una cabina de bioseguridad, usar toda la protección personal necesaria para tener una manipulación controlada y evitar riesgos al personal, a todos los materiales usados en el ensayo se le debe realizar una inactivación en el autoclave y finalmente disponerse en los recipientes de residuos peligrosos del laboratorio.

4.2. Manejo de cepas de reserva y de trabajo

Las cepas de referencia usadas para los diferentes análisis deben estar almacenadas en el ultracongelador a una temperatura de $-75\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$, cada que se haga uso de una de estas se debe reportar el gasto en el formato de control de cepas y no se deben volver a guardar en este después de utilizadas para evitar riesgos de contaminación.

Cuando se retiran del ultracongelador, se atemperan durante 10 minutos en la incubadora de 35 a 37°C

Las cepas de trabajo se ponen a crecer en una caja de Petri que contiene medio nutritivo sólido durante 24-48 horas a la temperatura ideal de crecimiento de cada microorganismo, donde estas serán los cultivos de trabajo, la trazabilidad de esta cepa se llevara en el FOR-TC-045, donde se indique el lote de la cepa, el nombre, código ATCC y el lote del agar en el que fue sembrada, estas cajas deben ser marcadas con el código interno después de realizar el registro en el sistema


Después de la incubación se almacenan en refrigeración (entre 0 a 4 °C) en la nevera de cepas durante 15 días a 1 mes envueltas en papel vinylpel o Parafilm siempre y cuando el medio de cultivo no presente pérdidas de volumen o desecación, de lo contrario debe colocarse a crecer una cepa nueva.

Cada vez que se saque un vial del ultracongelador se debe llevar registro del gasto en el formato de control de cepas de trabajo FOR-TC-046 y se debe realizar las pruebas establecidas en el formato

4.3. Patrones y equipos de medición.

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

- Vortex
- Transfer pipeta de 1000 µl

	<p style="text-align: center;">PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES MICROBIANAS</p> <p style="text-align: center;">AOXLAB S.A.S</p>	Identificación: PROC-TC-207
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2021-12-10

- Transfer pipeta de 100 µl
- Cabina flujo laminar
- Baño serológico
- Ultracongelador (-75 °C ± 5 °C)
- Nevera de cepas (0 - 4°C)
- Lector de placas Petrifilm

4.4. Materiales y consumibles

- Puntas para transfer pipeta de 1000 µL
- Puntas para transfer pipeta de 100 µL
- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Alcohol 70%
- Mechero
- Guantes de nitrilo
- Toallas de papel desechables
- Candela

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


5. Reactivos y/o soluciones

Agua peptonada en volúmenes de 10 ml y 9 ml

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

Solución	Cantidad reactivo	Cantidad Diluyente (Agua destilada)	Observaciones
Agua Peptonada estéril	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar en tubos de ensayo en volumen de 9 y 10 mL

Registrar la preparación de estas soluciones en el **FOR-TC 045**

	<p style="text-align: center;">PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES MICROBIANAS</p> <p style="text-align: center;">AOXLAB S.A.S</p>	Identificación: PROC-TC-207
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2021-12-10

5.1. Preparación de la suspensión inicial


5.1.1 A partir de las cajas de Petri almacenadas en la nevera de cepas que contienen los cultivos de trabajo de cada uno de los microorganismos a ensayar en los diferentes medios de cultivo ya sea referente o interferente, se dejan atemperar durante 5 minutos en la incubadora y se toma una colonia mediana, se transfiere a un tubo que contiene 10 ml de agua peptona, agitar suavemente en vortex e incubar a una temperatura de (35 ± 2) °C durante 16 a 24 h, para obtener una concentración aproximada de 1.5×10^8 células (ver grafica 1), el registro de la preparación de esta suspensión se llevara en el FOR-TC-045, donde se indique el código interno de la cepa de trabajo usada y el lote del agua peptona usada para realizar las suspensiones.

Las cepas de reserva utilizadas en el laboratorio corresponden a:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Salmonella typhimurium* ATCC 14028
- *Klebsiella aerogenes* ATCC 13048
- *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4353
- *Listeria monocytogenes* ATCC 19115
- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Bacillus cereus* ATCC 10876
- *Clostridium perfringens* ATCC 13124
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- *Escherichia coli* ATCC 8739
- *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

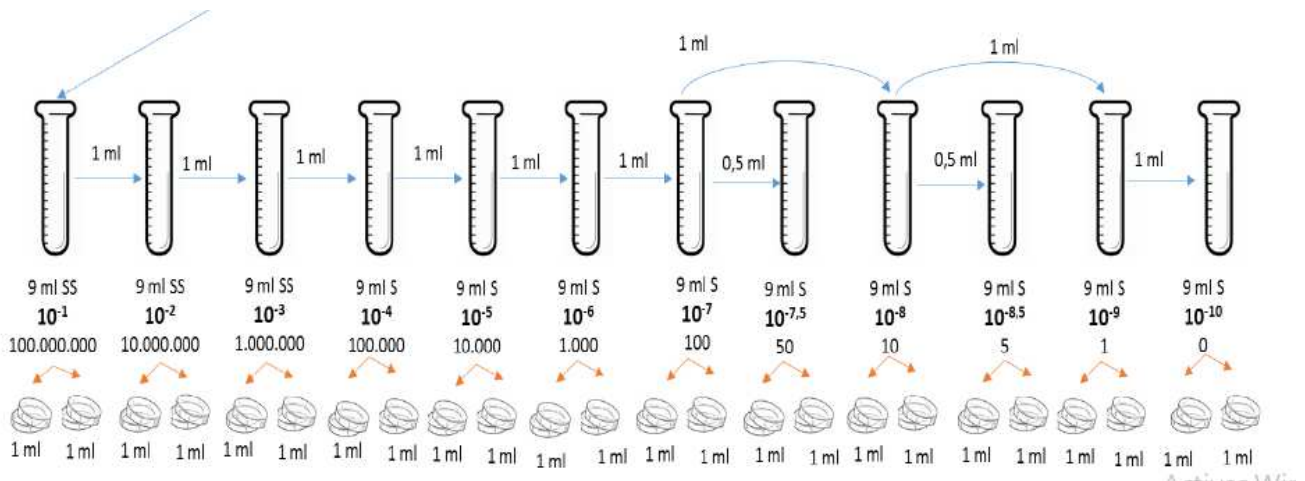
5.1.2 Después de 16-20 h, realice diluciones seriadas 1:10 (ver numeral 5.4), de este cultivo hasta 10^8 donde este caldo será la dilución 10^0 y la primera dilución es 10^{-1}

5.1.3 Siembre en profundidad 1 mL de las diluciones 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} en placas por duplicado en agar no selectivo (TSA, PCA o 3M™ Petrifilm recuento de Aerobios). Esto es un total de 6 placas (se podrían sembrar desde la dilución 10^{-4} , por si no está creciendo tan vigorosamente el microorganismo), y sería un total de 10 placas. Después de inocular las placas con las diluciones

	PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES MICROBIANAS AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-207
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2021-12-10

apropiadas, refrigere INMEDIATAMENTE las diluciones y el caldo para asegurar que las células se mantienen estáticas. Incube todas las placas a 35-37°C por 16-24 horas. Estas diluciones se pueden usar entre 24 y 72 horas siempre y cuando permanezcan refrigeradas

Nota: algunos microorganismos crecen fácilmente y son fácilmente contables a las 16 horas (Ej. Salmonella), sin embargo, otros pueden necesitar 24 horas (ej. Listeria).




Gráfica 1: Estandarización del inoculo

5.1.4 Remueva las placas de la incubadora y complete la siguiente tabla:

Dilución	UFC placa #1	UFC placa # 2	Promedio
10 ⁶			
10 ⁷			
10 ⁸			

Con esta información, se puede calcular el volumen requerido de la dilución para contaminar con una cantidad de microorganismo conocida la muestra a verificar, para métodos cualitativos el nivel de contaminación debe ser <10 células /25g de muestra (o equivalente) y para cuantitativos debe ser >10 células/g.

	PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES MICROBIANAS AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-207
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2021-12-10

Ejemplo

Dilución	UFC placa #1	UFC placa # 2	Promedio
10⁶	116	117	116.5
10⁷	7	9	8
10⁸	1	0	0.5

Siempre escoja para calcular el volumen de inóculo, las placas que contengan entre 25-250 colonias. Por ejemplo, usando los datos anteriores, el volumen debe ser calculado usando los resultados de la dilución 10⁻⁶. Si ninguna de las diluciones contiene placas con el rango requerido, utilice diluciones anteriores para realizar el cálculo.

5.2. Cálculo de volumen a adicionar para métodos cualitativos

Si el volumen de contaminación va a ser 5 células / muestra, entonces: Siempre procure utilizar un volumen de contaminación >100 µL, para reducir error potencial y realice la contaminación de manera aséptica directamente dentro de los 25 g de la muestra si es para Salmonella o listeria o dentro de los 10 g si es para otros microorganismos.

A partir del promedio de los recuentos realizar el siguiente cálculo de acuerdo con el número aproximado de UFC que se requiera:

$$\frac{\#UFC\ requeridas}{promedio\ del\ recuento} \times 1000 = cantidad\ \mu l\ requeridos\ para\ adicionar\ a\ la\ muestra$$


Ejemplo: si se necesita adicionar 5 UFC a las muestras

$$\frac{5UFC}{8} \times 1000 = 625\ \mu l$$

Lo ideal es seleccionar la dilución en la que se deba adicionar más de 100 µl

Contaminación de la muestra:

- Inocular cada muestra con el volumen adecuado, dispensando el inóculo directamente sobre la muestra.
- Agregue asépticamente la muestra al volumen recomendado de caldo de enriquecimiento y homogenice durante 2 minutos e incubar a la temperatura de incubación recomendada según el microorganismo a evaluar

	<p style="text-align: center;">PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES MICROBIANAS</p> <p style="text-align: center;">AOXLAB S.A.S</p>	Identificación: PROC-TC-207
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2021-12-10

- Homogenice la muestra.

Para la adición de los inóculos a las muestras se debe tener en cuenta la concentración que se desea evaluar

- Concentración baja < 5 UFC
- Concentración media 30-40 UFC
- Concentración alta > 50 UFC

5.3. Cálculo de volumen a adicionar para métodos cuantitativos

Después de obtener los resultados del promedio para cada dilución de acuerdo con el numeral 5.1.4 utilizar la siguiente fórmula de acuerdo con las UFC deseadas.

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

Donde:

C1= el promedio de UFC obtenidas en una dilución


V1= volumen que deseo conocer

C2= concentración deseada en UFC

V2= volumen de diluyente

5.4. Preparación de las diluciones seriadas para recuento en placa

- Pipetear 1 ml \pm 5 % de la suspensión inicial (10^0) después de haber agitado en el vortex y adicionar a un tubo que contiene 9 ml de agua peptona para obtener la dilución 10^{-1} y agitar cuidadosamente en vortex durante 30 segundos, a partir de este tomar 1 ml y adicionar a un tubo que contiene 9 ml de agua peptona para obtener la dilución 10^{-2} agitar cuidadosamente en vortex durante 30 segundos.
- Repita este procedimiento de tubo en tubo hasta obtener la dilución deseada de acuerdo con la cantidad de UFC requeridas (ver grafica 1)
- Cada dilución sucesiva disminuirá 10 veces la concentración (conocido como dilución seriada en base 10).

	<p style="text-align: center;">PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES MICROBIANAS</p> <p style="text-align: center;">AOXLAB S.A.S</p>	Identificación: PROC-TC-207
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2021-12-10

6. Aseguramiento de la calidad

Para asegurar y controlar la validez de los resultados, se debe garantizar que se cumplan todos los criterios mencionados durante el procedimiento, asegurar el control de esterilidad para cada lote del diluyente usado y que la cepa de trabajo cumpla con las pruebas bioquímicas básicas que se realizan.

7. RESPONSABILIDADES.

7.1. Director técnico.

- Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.
- Revisar y aprobar los informes técnicos una vez han sido revisados por el Líder de Laboratorio.
- Asesorar y orientar los analistas en la resolución de dudas e inconvenientes surgidos durante el desarrollo de los ensayos.
- Realizar o revisar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método y autorizar las indicaciones a seguir.
- Establecer los casos en los cuales se realiza la retención de muestras.

7.2. Líder de Calidad.


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

7.3. 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.

7.4. Analista.

- Seguir todas las instrucciones establecidas en este procedimiento y en el reglamento del laboratorio

	<p style="text-align: center;">PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES MICROBIANAS</p> <p style="text-align: center;">AOXLAB S.A.S</p>	Identificación: PROC-TC-207
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2021-12-10

- Ingresar y entregar todos los resultados en los tiempos pactados.
- Entregar formatos de datos primarios completamente diligenciados al líder del laboratorio.
- Realizar revisión de datos primarios y cálculos realizados en los cuadros de mandos, informar al líder del laboratorio en caso de observar alguna desviación en los resultados obtenidos teniendo en cuenta las cartas control.
- Registrar los resultados de los ensayos de control de calidad y hacer el análisis de tendencias de estos.
- Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica.
- Informar al líder de laboratorio las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.
- Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder del laboratorio.
- Informar cualquier incidente que suceda durante la realización del método.
- Revisar que los equipos usados en el desarrollo del método tengan mantenimiento, calibración y/o verificación vigente, de acuerdo con el programa de mantenimiento y calibración.

8. FORMATOS RELACIONADOS.

FOR-TC-046 "Formato de control de cepas de trabajo"

FOR-TC-045 "Formato para el registro de información y asignación de lote de las soluciones preparadas para uso en los ensayos"

9. ANEXOS.