

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

MANUAL

DE

MICROBIOLOGÍA SANITARIA

Laboratorio de Análisis Clínicos FCQ.UACH

	ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Nombre	Q.B.P. David Quiroz Cardoza	M.A. Carmen Alicia Murillo Nevárez	M.A. Oscar René Valdez Domínguez
Puesto	Departamento de Microbiología	Coordinador de Técnico	Director del Laboratorio
Fecha	11 de Enero 2018	11 de Enero 2018	11 de Enero 2018
Firma			

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

CONTENIDO

CUENTA DE BACTERIAS MESOFÍLICAS AEROBIAS EN PLACA.....	3
CUENTA DE BACTERIAS COLIFORMES TOTALES EN PLACA	9
DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES. TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE.	15
CUENTA DE MOHOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS.....	23
RETO MICROBIANO POR MICRODILUCIÓN.....	30
HISTORIAL DE REVISIONES	37

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

CUENTA DE BACTERIAS MESOFÍLICAS AEROBIAS EN PLACA	
Propósito del examen	El propósito de esta técnica consiste en contar las colonias, que se desarrollan en el medio de elección después de un cierto tiempo y temperaturas de incubación, presuponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo, para la estimación del número de bacterias que se encuentran en la muestra analizada.
Principio y método del procedimiento utilizado para el examen	La cuenta en placas es la técnica comúnmente utilizada cuando se requiere investigar el contenido de microorganismos viables en un alimento (NOM-092-SSA1-1994). La cuenta en placa consiste en contar las colonias que logran crecer en un medio de cultivo general después de un periodo de incubación a una temperatura dentro del rango de las bacterias mesofílicas. Se hace la suposición de que cada colonia proviene de un solo microorganismo que tiene la capacidad de producir dicha colonia (UFC) y que se encontraba en la muestra analizada. Agregando el reactivo TTC, el cual sirve como indicador del crecimiento bacteriano al insertarse en la membrana de las bacterias lo que ocasiona que la colonia se tiña de un color rojizo, nos permite visualizar mejor las colonias y facilita el conteo, así como permite diferenciar las colonias de los restos de muestra que pudieran haber quedado en el agar sin importar tamaño, o intensidad de color.
Características de desempeño	No aplica
Tipo de muestra	Alimentos

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

	Se tomarán con las pinzas utilizadas para su distribución, y se colocarán en bolsas o recipientes estériles para su transporte al laboratorio.
Preparación del paciente	No aplica
Tipo de contenedor y aditivos	Ver MAN-TM-01
Equipo y reactivos requeridos	Incubadora Mechero Balanza granataria Balanza analítica Autoclave Baño maría Matraz Erlenmeyer Parrilla eléctrica Propipetero Pipetas Vasos de vidrio Abatelenguas Agar para métodos estándar (triptona-extracto de levadura) Cloruro de trifeniltetrazolio (TTC)
Controles ambientales y de seguridad	El personal del área debe utilizar los implementos de bioseguridad como son: bata de laboratorio, guantes, lentes de seguridad y cubre bocas cuando sean manejadas las muestras microbiológicas. Los cultivos generados en el procedimiento son considerados biológico-infecciosos y deben depositarse en bolsa roja, previamente identificada como cepas y cultivos. Ref. MAN-SH-01, MAN-RPBI-01.
Procedimientos de	No aplica

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

calibración	
Pasos del procedimiento	Preparación del medio de cultivo. 1) Se realiza previo a obtención de las muestras, suspender el medio deshidratado en un litro de agua o los mililitros correspondientes a los gramos a preparar hervir hasta su disolución. 2) Una vez homogéneo se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. 3) Al momento de usar, enfriar el medio a 45°C en baño de agua y mantenerlo a esa temperatura hasta su uso. 4) Todo material que tendrá contacto con las muestras o los microorganismos deberán estar previamente estériles. Preparación y dilución de las muestras. 1) Muestras solidas o semisólidas, pesar 10.0 gramos de la muestra por analizar en un recipiente o bolsa plástica estéril de tamaño adecuado. 2) Adicionar un volumen de 90 mL del diluyente, según sea el caso llevado a una temperatura similar a la de la muestra esta será la dilución primaria 1:10. 3) Agitar frecuentemente para homogenizar las muestras hasta obtener una suspensión completa. 4) Permitir que las partículas grandes se sedimenten, y transferir la cantidad deseada (alícuota), tomando las capas superiores de la suspensión. 5) Transferir 1.0 mL o un múltiplo de la dilución primaria, a otro recipiente que contenga nueve volúmenes del diluyente estéril evitando contacto entre la pipeta y el diluyente. Si se toma 1.0 mL de muestra en 9.0 mL de diluyente, so obtendrá una dilución 1:100. 6) La selección de las diluciones a preparar, así como de

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

	aquellas que se van a inocular, depende del número esperado de microorganismos en la muestra, con base a resultados de análisis previos y de la información que se obtenga al recolectar la muestra, en ausencia total de información, trabajar con las diluciones de la primera a la sexta. 7) Utilizar pipetas diferentes para cada dilución inoculando simultáneamente las cajas seleccionadas. El volumen transferido debe ser el 10% de la capacidad total de la pipeta. 8) Al tener las cajas rotuladas en la parte de las tapas y con la muestra dentro y una caja sin muestra que servirá de testigo de esterilidad, adicionar una gota de TTC, se procede a agregar de 12 a 15 ml del medio preparado, mezclarlo mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el medio no moje la cubierta de las cajas. Dejar solidificar. 9) Incubar las cajas a temperatura de $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 hrs. 10) Seleccionar aquellas cajas que tengan entre 25 a 250 UFC, para disminuir el error en la cuenta.
Procedimientos de control de calidad	No aplica
Interferencias	No aplica
Principios del procedimiento para el cálculo de resultados	Después de haber realizado el conteo de las colonias en las placas se deberá multiplicar el resultado del conteo por el factor de dilución que en este caso podrá ser 10, 100, 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , etc. Para

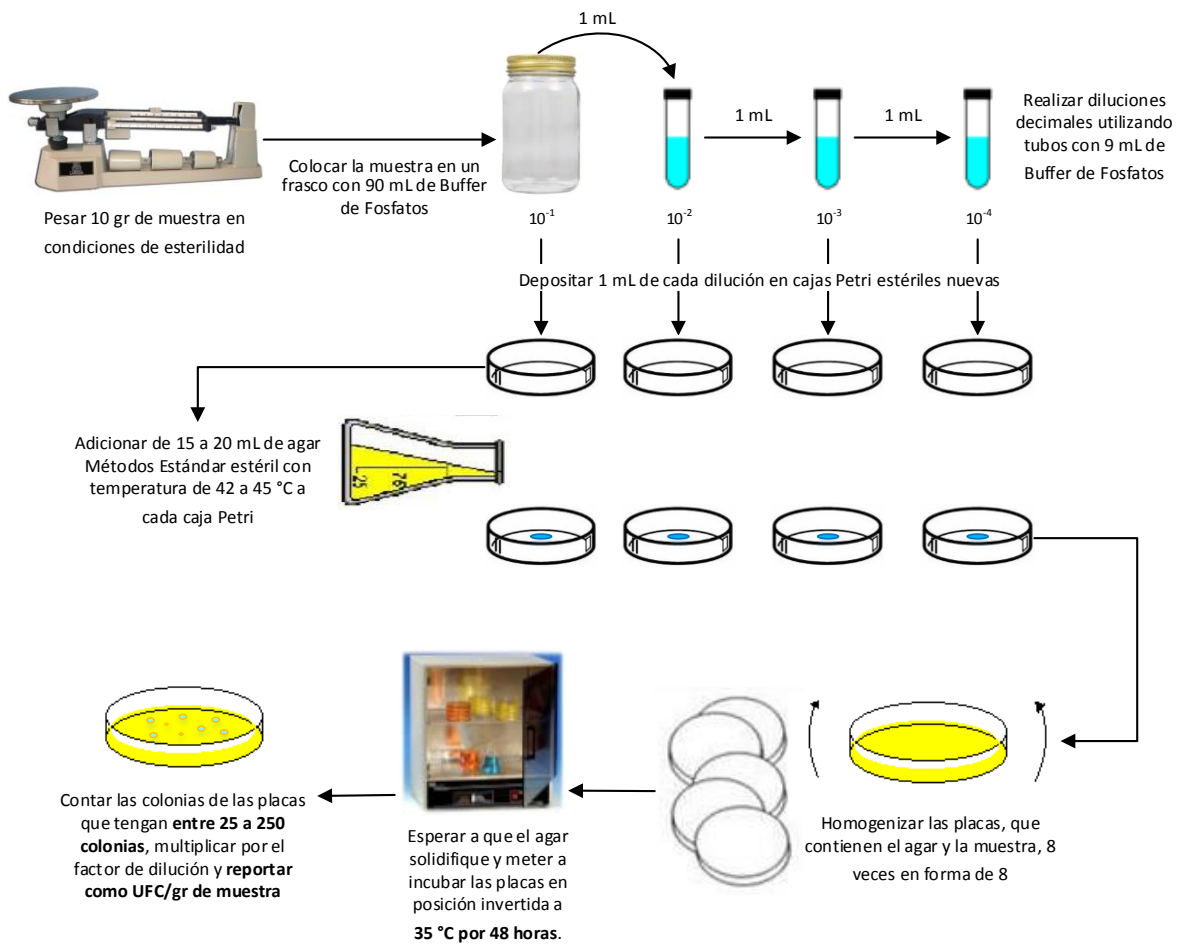
	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

	poder determinar el número de UFC/ mL o gr de muestra.
Intervalos de referencia biológica o valores de decisión clínica	<150,000 UFC/ml *Los criterios microbiológicos reportados en este formato, tienen un carácter orientativo y corresponden a la NOM-093-SSA1-1994 la cuál ha sido cancelada y sustituida por la NOM-251-SSA1-2009 “Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios”, en la cual no se anexan dichos criterios. Por lo tanto la interpretación de los límites microbiológicos en los resultados emitidos por el Laboratorio, quedan a criterio y responsabilidad del solicitante.
Intervalo reportable de los resultados del examen	No aplica
Instrucciones para determinar los resultados cuantitativos	Se determina mediante las diluciones realizadas a dicha muestra y se cuantifican las cajas que contengan entre 25 y 250 UFC/mL.
Valores de alerta o críticos	No aplica
Interpretación clínica del laboratorio	La cuenta de bacterias aerobias en placa permite estimar la cantidad de microorganismos presentes en un alimento, no se pretende detectar todos los microorganismos presentes, pero el medio de cultivo, las condiciones de temperatura y la presencia de oxígeno, permiten seleccionar grupos de bacterias cuya presencia es importante en diferentes alimentos las cuales son indicadores de la población presente en una muestra y, por lo tanto, de la higiene con que ha sido manejado el producto.
Fuentes potenciales de variación	La temperatura de la incubadora debe permanecer en 35 ± 1 °C, ya que puede ser una fuente de variabilidad en el crecimiento de los microorganismos.
Referencias	NOM-251-SSA1-2009 “Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios” NOM-092-SSA1-1994 “Bienes y servicios. Método para la cuenta de

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

bacterias aerobias en placa"

DETERMINACIÓN DE MESOFÍlicos POR CONTEO EN PLACA



	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

CUENTA DE BACTERIAS COLIFORMES TOTALES EN PLACA	
Propósito del examen	El método permite determinar el número de microorganismos coliformes totales presentes en una muestra de alimentos por medio de la técnica de conteo en placa, utilizando un medio selectivo (Agar de bilis rojo y violeta).
Principio y método del procedimiento utilizado para el examen	El grupo de los microorganismos coliformes es el más ampliamente utilizado en microbiología de los alimentos como indicador de prácticas higiénicas adecuadas. La demostración y la cuenta de microorganismos coliformes, puede realizarse mediante el empleo de medios de cultivo líquido o sólido con características diferenciales o selectivas. Para la cuenta en placa se usa el agar de bilis rojo y violeta (ABRV). Los coliformes resisten la presencia de bilis en el medio de cultivo; cuando se desarrollan en ABRV, el ácido producido por la fermentación de la lactosa, ocasiona el vire del indicador rojo neutro y la precipitación de las sales biliares por lo que las colonias son color rojo oscuro y generalmente están rodeadas de un halo de sales biliares precipitadas, de color rojo claro o rosa. La posibilidad de contar las colonias se fundamenta en su dispersión y separación.
Características de desempeño	No aplica
Tipo de muestra	Alimentos Se tomarán con las pinzas utilizadas para su distribución, y se colocarán en bolsas o recipientes estériles para su transporte al laboratorio.
Preparación del	No aplica

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

paciente	
Tipo de contenedor y aditivos	Ver MAN-TM-01
Equipo y reactivos requeridos	Incubadora Mechero Balanza granataria Balanza analítica Autoclave Baño maría Matraz Erlenmeyer Parrilla eléctrica Propipetero Pipetas Vasos de vidrio Abatelenguas Agar de bilis y rojo violeta
Controles ambientales y de seguridad	El personal del área debe utilizar los implementos de bioseguridad como son: bata de laboratorio, guantes, lentes de seguridad y cubre bocas cuando sean manejadas las muestras microbiológicas. Los cultivos generados en el procedimiento son considerados biológico- infecciosos y deben depositarse en bolsa roja, previamente identificada como cepas y cultivos. Ref. MAN-SH-01, MAN-RPBI-01.
Procedimientos de calibración	No aplica
Pasos del procedimiento	Preparación del medio de cultivo. 1) Se realiza previo a obtención de las muestras, suspender el medio deshidratado en un litro de agua o los mililitros

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

	correspondientes a los gramos a preparar hervir hasta su disolución. 2) Una vez homogéneo se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. 3) Al momento de usar, enfriar el medio a 45°C en baño de agua y mantenerlo a esa temperatura hasta su uso. 4) Todo material que tendrá contacto con las muestras o los microorganismos deberán estar previamente estériles. Preparación y dilución de las muestras. 1) Muestras solidas o semisólidas, pesar 10.0 gramos dela muestra por analizar en un recipiente o bolsa plástica estéril de tamaño adecuado, en el caso de aguas preparadas se tomará directamente de la muestra sin realizar diluciones. 2) Adicionar un volumen de 90 mL del diluyente, según sea el caso llevado a una temperatura similar a la de la muestra esta será la dilución primaria 1:10. 3) Agitar frecuentemente para homogenizar las muestras hasta obtener una suspensión completa. 4) Permitir que las partículas grandes se sedimenten, y transferir la cantidad deseada (alícuota), tomando las capas superiores de la suspensión. 5) De la alícuota tomada distribuir en las placas previamente rotuladas y agregar el medio de cultivo con la técnica de vaciado en placa y una caja sin muestra que servirá de testigo de esterilidad, se procede a agregar de 12 a 15 ml del medio preparado, mezclarlo mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr
--	---

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

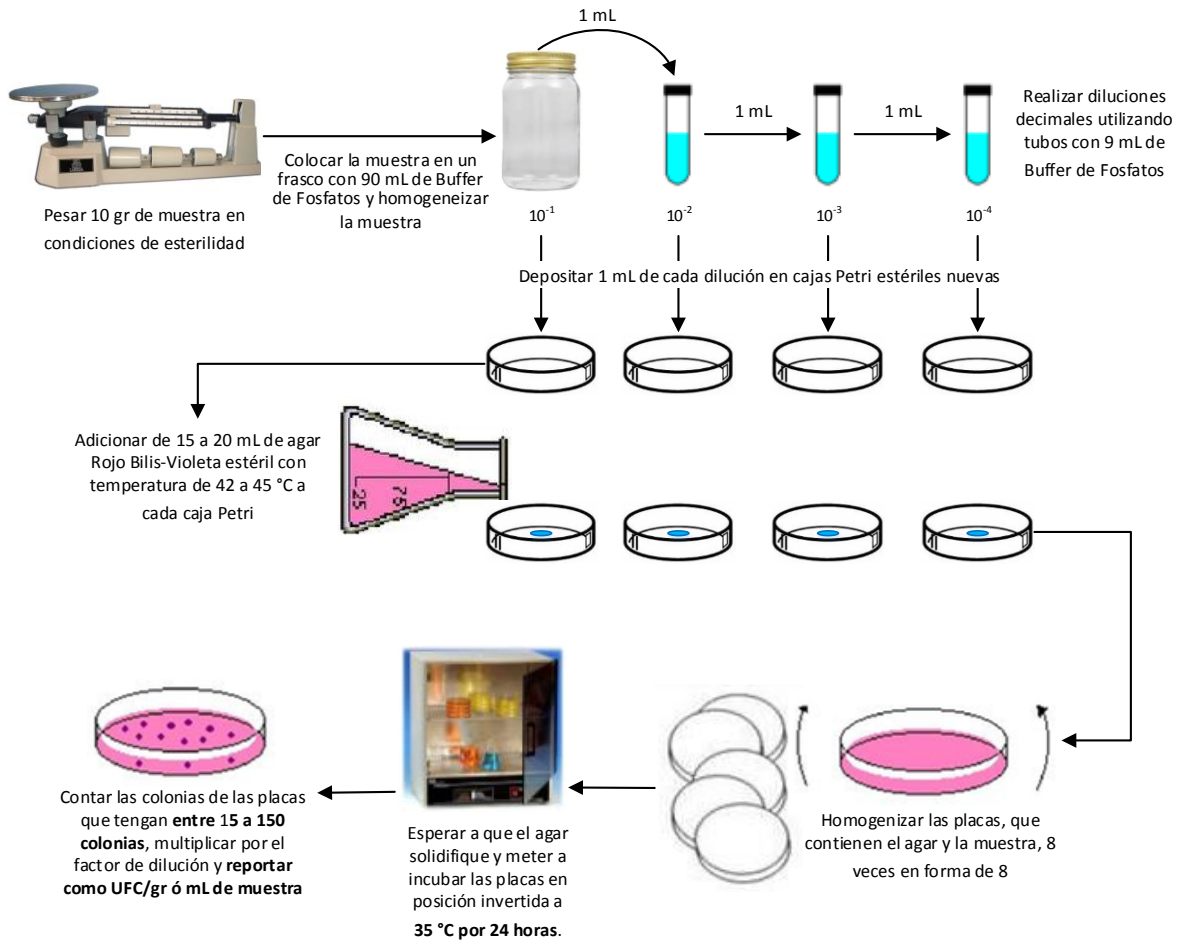
	una completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el medio no moje la cubierta de las cajas. Dejar solidificar. 6) Incubar las cajas a temperatura de $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h. 7) Seleccionar aquellas cajas que tengan entre 15 a 150 UFC, para disminuir el error en la cuenta.
Procedimientos de control de calidad	No aplica
Interferencias	No aplica
Principios del procedimiento para cálculo de resultados	Después de haber realizado el conteo de las colonias en las placas se deberá multiplicar el resultado del conteo por el factor de dilución que en este caso podrá ser 10, 100, 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , etc. Para poder determinar el número de UFC/ mL o gr de muestra.
Intervalos de referencia biológica o valores de decisión clínica	<10 totales en muestras sólidas y semisólidas. <100 totales en aguas preparadas. *Los criterios microbiológicos reportados en este formato, tienen un carácter orientativo y corresponden a la NOM-093-SSA1-1994 la cuál ha sido cancelada y sustituida por la NOM-251-SSA1-2009 “Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios”, en la cual no se anexan dichos criterios. Por lo tanto la interpretación de los límites microbiológicos en los resultados emitidos por el Laboratorio, quedan a criterio y responsabilidad del solicitante.
Intervalo reportable de los resultados del examen	No aplica

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

Instrucciones para determinar los resultados cuantitativos	Se determina mediante las diluciones realizadas a dicha muestra y se cuantifican las cajas que contengan entre 15 y 150 UFC/mL.
Valores de alerta o críticos	No aplica
Interpretación clínica del laboratorio	El uso de coliformes como indicador sanitario puede aplicarse para: • La detección de prácticas sanitarias deficientes en el manejo y en la fabricación de los alimentos. • La evolución de la calidad microbiológica de un producto, aunque su presencia no necesariamente implica un riesgo sanitario. • Evaluación de la eficiencia de prácticas sanitarias e higiénicas del equipo. • La demostración y la cuenta de microorganismos coliformes, puede realizarse mediante el empleo de medios de cultivo sólidos con características diferenciales o selectivas.
Fuentes potenciales de variación	La temperatura de la incubadora debe permanecer en $35^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, ya que puede ser una fuente de variabilidad en el crecimiento de los microorganismos.
Referencias	NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa NOM-251-SSA1-2009 "Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios"

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

DETERMINACIÓN DE COLIFORMES POR CONTEO EN PLACA



	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES. TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE.	
Propósito del examen	El método estima el número de bacterias coliformes presentes en una muestra de alimento o agua, calculando estadísticamente el Numero Más Probable (NPM).
Principio y método del procedimiento utilizado para el examen	Las bacterias coliformes son un grupo heterogéneo compuesto por varias bacterias de diferentes familias, existe poca evidencia que indique que estas bacterias coliformes pertenezcan a un solo género taxonómico. Las bacterias coliformes tienen la capacidad de fermentar la lactosa, produciendo ácido y gas el cual se manifiesta en campanas de fermentación, lo que nos permite detectar su crecimiento en los tubos de cultivo. El número de microorganismos se establece mediante la técnica del número más probable o también llama técnica de dilución en tubo, proporciona una estimación estadística de la densidad microbiana presente con base a que la probabilidad de obtener tubos con crecimiento positivos disminuye conforme es menor el volumen de muestra inoculado. Y al utilizar altas temperaturas en el baño de agua y el medio confirmatorio se establece la presencia de coliformes fecales termorresistentes.
Características de desempeño	No aplica
Tipo de muestra	Alimentos. Se tomarán con las pinzas utilizadas para su distribución, y se colocarán en bolsas o recipientes estériles para su transporte al laboratorio.

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

	Agua. Se tomará en vaso estériles, limpiando con alcohol al 70% y una gasa la llave de la tarja y se deja correr por 5 a 10 segundos el agua para su recolección, en el caso de ser necesario utilizar tiosulfato de sodio para inhibir los agentes clorados. Hielo. Utilizar el cucharón o las pinzas utilizadas en el hielo, y tomar en vasos estériles por duplicado para asegurar que al descongelarse el agua sea suficiente al inocular los tubos.
Preparación del paciente	No aplica
Tipo de contenedor y aditivos	Ver MAN-TM-01
Equipo y reactivos requeridos	Incubadora Mechero Balanza granataria Balanza analítica Autoclave Baño maría Matraz Erlenmeyer Parrilla eléctrica Propipetero Pipetas Vasos de vidrio Abatelenguas Campanas de Durham Tubos de cultivo Caldo lauril sulfato de sodio Caldo lactosa lauril verde brillante Caldo para <i>Escherichia coli</i> (EC)

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

Controles ambientales y de seguridad	El personal del área debe utilizar los implementos de bioseguridad como son: bata de laboratorio, guantes, lentes de seguridad y cubre bocas cuando sean manejadas las muestras microbiológicas. Los cultivos generados en el procedimiento son considerados biológico- infecciosos y deben depositarse en bolsa roja, previamente identificada como cepas y cultivos. Ref. MAN-SH-01, MAN-RPBI-01.
Procedimientos de calibración	No aplica
Pasos del procedimiento	Para agua potable y hielo. 1) Agitar la muestra. 2) Transferir a volúmenes de 10 mL de muestra a cada uno de los 5 tubos con 10ml de caldo lauril sulfato de sodio de mayor concentración y 1 mL y 0.1 mL de muestra a cada uno de los tubos de las series de 5 respectivamente con 10 mL de caldo lauril sulfato a concentración sencilla. 3) Incubar los tubos a 35°C. examinar a las 24 horas y observar la presencia o formación de gas, si no se observa en ese tiempo incubar por 24 horas más. Prueba para coliformes totales. De cada tubo que muestre formación de gas, tomar una asada y sembrar en un número igual de tubos con medio de confirmación caldo lactosa lauril verde brillante, incubar a 35°C por 24 horas o su prolongación a 48 horas en el caso de no observar gas. Prueba confirmativa para coliformes fecales.

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

	De cada tubo que muestre formación de gas, tomar una asada y sembrar en un número igual de tubos con medio de confirmación caldo EC (Caldo para <i>Escherichia coli</i>), incubar en baño de agua a temperatura de 44.5°C durante 24 horas o su prolongación a las 48 horas en caso de no observar la presencia de gas. Para alimentos. 1) Preparar 9 tubos de caldo lauril sulfato de sodio cada uno con 10 mL a concentración sencilla. 2) Tomar la primera dilución del buffer de fosfatos preparada previamente para la cuenta de mesófilos en placa, e inocular los primeros tres tubos agregando 1 mL de muestra posteriormente agregar 1 mL a un tubo de 9 mL de buffer de fosfatos para realizar una dilución 1:100 y agregar a los segundos 3 tubos, para finalizar agregar 1 mL de la muestra de la dilución 1:100 a un tubo con 9 mL de buffer para realizar la dilución 1:1000 e inocular la última serie de 3 tubos. 3) Incubar a 35°C. examinar a las 24 horas y observar la presencia de gas, si no se observa incubar por 24 horas más. Prueba confirmatoria para confirms fecales. De cada tubo que muestre formación de gas, tomar una asada y sembrar en un número igual de tubos con medio de confirmación caldo EC (Caldo para <i>Escherichia coli</i>), incubar en baño de agua a temperatura de 45.5°C durante 24 horas o su prolongación a las 48 horas en caso de no observar la presencia de gas. Opcional se puede agregar una gota de indol para confirmar la presencia de coliformes fecales.
--	--

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

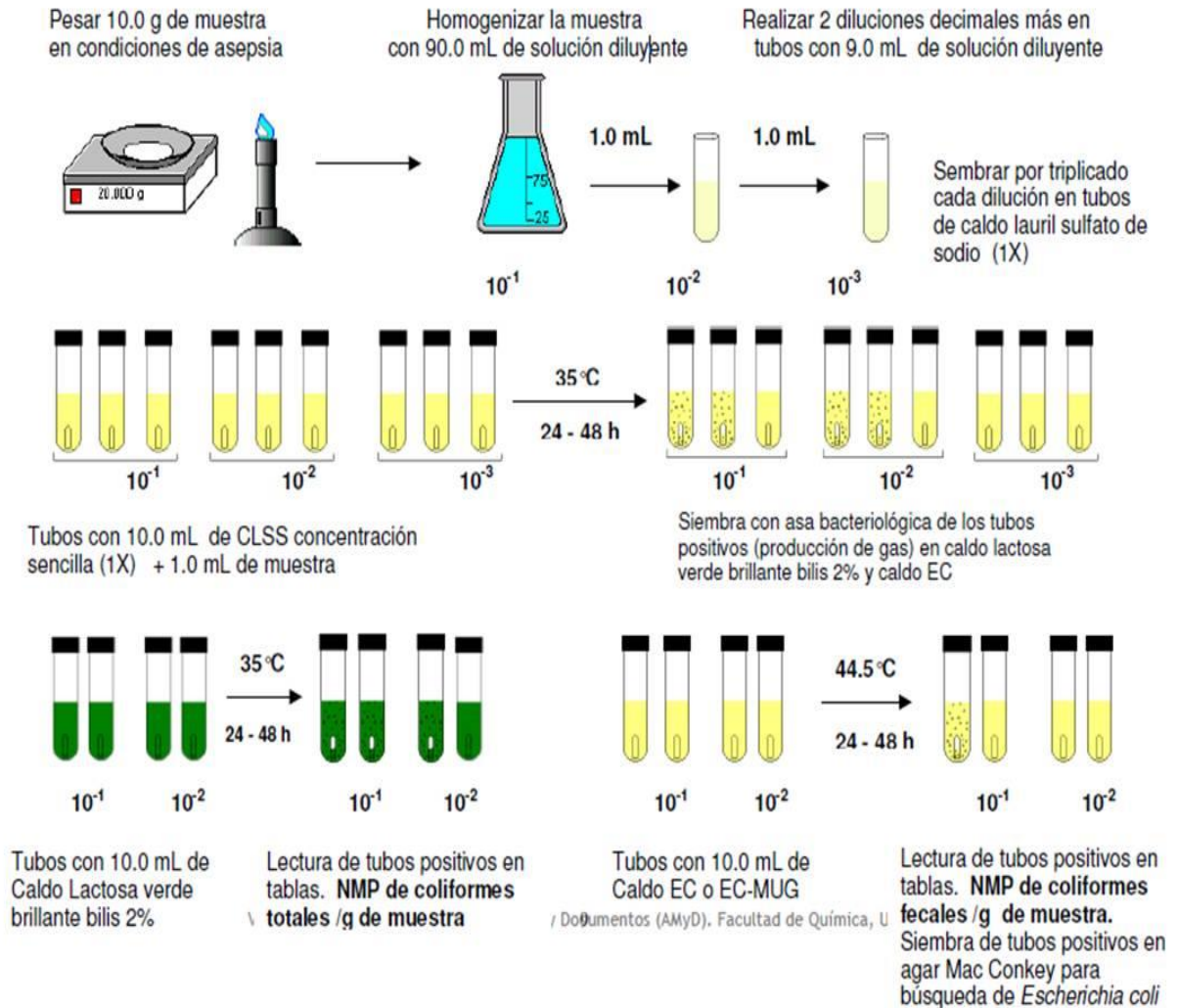
Procedimientos de control de calidad	No aplica
Interferencias	No aplica
Principios del procedimiento para el cálculo de resultados	Tomar la serie de tubos de la prueba confirmativa que de formación de gas después del período de incubación requerido y buscar el NMP en las tablas correspondientes ubicadas en la NOM-210-SSA1-2014.
Intervalos de referencia biológica o valores de decisión clínica	<3 fecales.
Intervalo reportable de los resultados del examen	No aplica
Instrucciones para determinar los resultados cuantitativos	No aplica
Valores de alerta o críticos	No aplica
Interpretación clínica del laboratorio	Al observar la presencia de ácido y gas en las prueba presuntiva se establece que existen otros microorganismos capaces de realizar la fermentación de la lactosa, por ende al realizar la prueba confirmatoria y el aumento de la temperatura se establece entonces la presencia de coliformes fecales lo cual indicara un manejo deficiente hacia el producto y las malas prácticas de higiene del personal que maneja y distribuye estos.

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

Fuentes potenciales de variación	La temperatura de la incubadora debe tener máximo una variación de 0.5°C, ya que puede ser una fuente de variabilidad en el crecimiento de los microorganismos. La temperatura del baño de agua debe permanecer estable con una variación máxima de 0.2°C ya que de este dependerá la presencia de los coliformes termo-resistentes.
Referencias	NOM-112-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable. NOM-251-SSA1-2009 “Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios” NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos

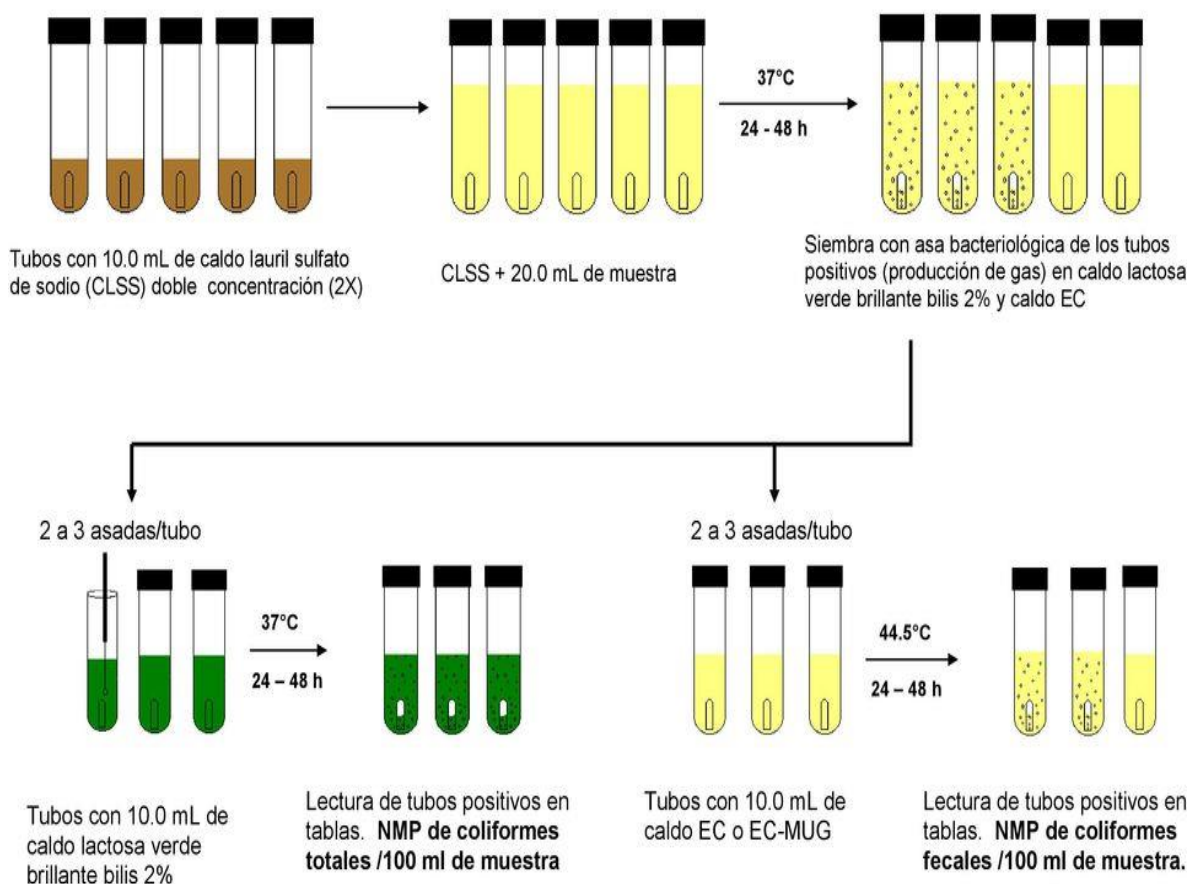
	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

DETERMINACIÓN DEL NMP DE COLIFORMES EN MUESTRAS SÓLIDAS O ALIMENTOS



	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

DETERMINACIÓN DEL NMP DE COLIFORMES EN AGUA Y HIELO POTABLES



	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

CUENTA DE MOHOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS

Propósito del examen	Determinar el número de mohos y levaduras viables presentes en muestras de alimentos, acidificando a un pH de 3,5 e incubando a temperaturas de 25°C dando como resultado colonias características de estos microorganismos.
Principio y método del procedimiento utilizado para el examen	Los hongos y levaduras están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se pueden encontrar formando parte de la microbiota normal de un alimento, o como agentes contaminantes y en los equipos sanitizados inadecuadamente, provocando el deterioro fisicoquímico de estos, debido a la utilización en su metabolismo de los carbohidratos, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos originando mal olor, alterando el sabor y el color en la superficie de los productos contaminados. La cuenta en placa es el método ideal para la cuenta de hongos y levaduras, al inocular una muestra de cantidad conocida de muestra, en un medio de cultivo selectivo, aprovechando la capacidad de estos microorganismos de utilizar nutrientes como polisacáridos que contiene el medio. La hidrólisis de estos compuestos se efectúa por enzimas que posee este grupo microbiano. La sobrevivencia de los hongos y levaduras a pH ácido se pone en manifiesto al inocularlos en el medio de cultivo acidificado a un pH de 3,5. Así mismo, la acidificación permite la eliminación de la mayoría de las bacterias. Finalmente, las condiciones de aerobiosis y la incubación a una temperatura de 25°C da como resultado el crecimiento de colonias características para este tipo de microorganismos.

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

Características de desempeño	No aplica
Tipo de muestra	Alimentos Se tomarán con las pinzas utilizadas para su distribución, y se colocarán en bolsas o recipientes estériles para su transporte al laboratorio.
Preparación del paciente	No aplica
Tipo de contenedor y aditivos	Ver MAN-TM-01
Equipo y reactivos requeridos	Incubadora Mechero Balanza granataria Balanza analítica Autoclave Baño maría Matraz Erlenmeyer Parrilla eléctrica Propipetero Pipetas Vasos de vidrio Abatelenguas Agar papa dextrosa (PDA) Acido tartárico 10% estéril
Controles ambientales y de seguridad	El personal del área debe utilizar los implementos de bioseguridad como son: bata de laboratorio, guantes, lentes de seguridad y cubre bocas cuando sean manejadas las muestras microbiológicas. Los cultivos generados en el procedimiento son considerados

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

	biológico- infecciosos y deben depositarse en bolsa roja, previamente identificada como cepas y cultivos. Ref. MAN-SH-01, MAN-RPBI-01.
Procedimientos de calibración	No aplica
Pasos del procedimiento	Preparación del medio de cultivo. 1) Se realiza previo a obtención de las muestras, suspender el medio deshidratado en un litro de agua o los mililitros correspondientes a los gramos a preparar hervir hasta su disolución. 2) Una vez homogéneo se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. 3) Al momento de usar, enfriar el medio a 45°C en baño de agua y mantenerlo a esa temperatura hasta su uso en este punto acidificar el medio con la concentración adecuada. Para cada 100 mL de medio se adicionan 14 mL de ácido tartárico al 10%. 4) Todo material que tendrá contacto con las muestras o los microorganismos deberán estar previamente estériles. Preparación y dilución de las muestras. 1) Muestras solidas o semisólidas, pesar 10.0 gramos de la muestra por analizar en un recipiente o bolsa plástica estéril de tamaño adecuado. 2) Adicionar un volumen de 90 mL del diluyente, según sea el caso llevado a una temperatura similar a la de la muestra esta será la dilución primaria 1:10. 3) Agitar frecuentemente para homogenizar las muestras hasta obtener una suspensión completa. 4) Permitir que las partículas grandes se sedimenten, y

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

	transferir la cantidad deseada (alícuota), tomando las capas superiores de la suspensión. 5) Transferir 1.0 mL o un múltiplo de la dilución primaria, a otro recipiente que contenga nueve volúmenes del diluyente estéril evitando contacto entre la pipeta y el diluyente. Si se toma 1.0 mL de muestra en 9.0 mL de diluyente, se obtendrá una dilución 1:100. 6) La selección de las diluciones a preparar, así como de aquellas que se van a inocular, depende del número esperado de microorganismos en la muestra, con base a resultados de análisis previos y de la información que se obtenga al recolectar la muestra, en ausencia total de información, trabajar con las diluciones de la primera a la sexta. 7) Utilizar pipetas diferentes para cada dilución inoculando simultáneamente las cajas seleccionadas. El volumen transferido debe ser el 10% de la capacidad total de la pipeta. 8) Al tener las cajas rotuladas en la parte de las tapas y con la muestra dentro y una caja sin muestra que servirá de testigo de esterilidad, se procede a agregar de 12 a 15 ml del medio preparado, mezclarlo mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el medio no moje la cubierta de las cajas. Dejar solidificar. 9) Incubar las cajas a temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 3, 4 ó 5 días h.
--	---

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

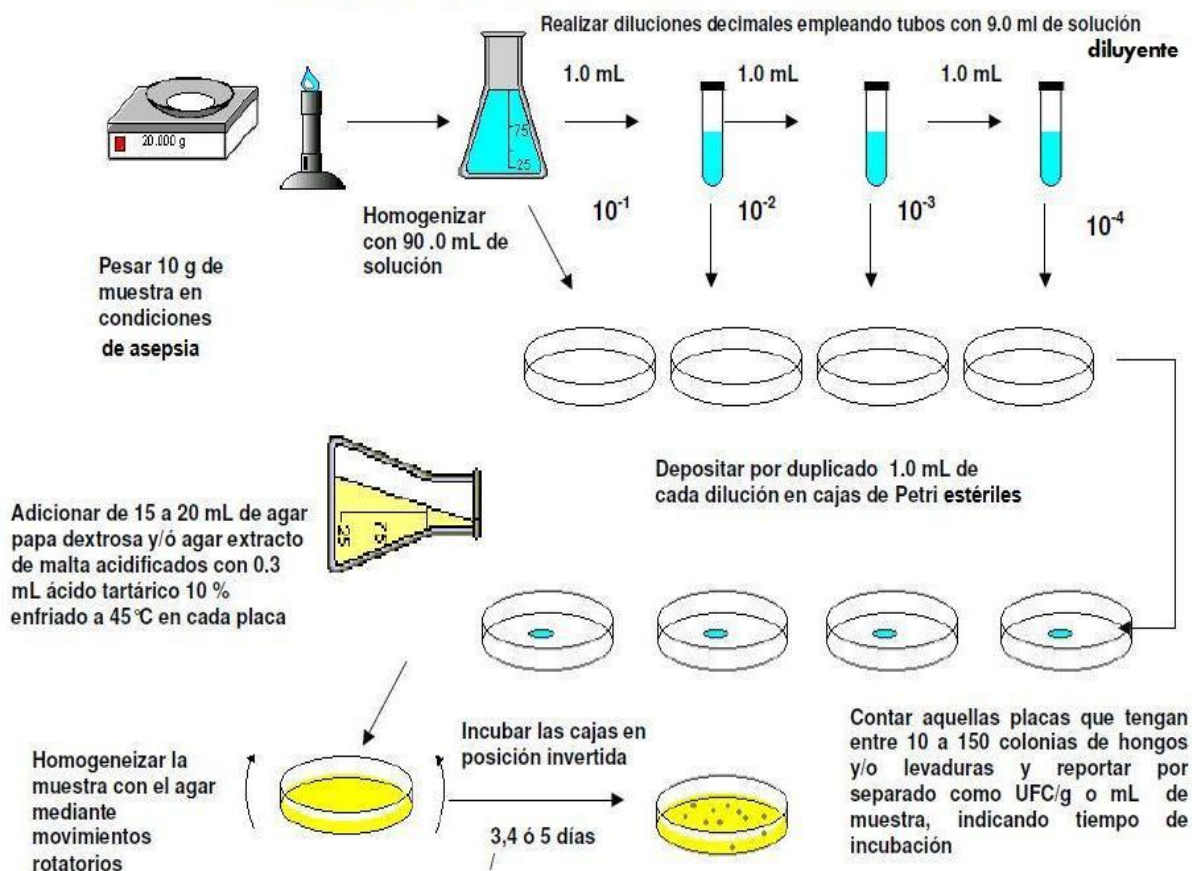
	Seleccionar aquellas cajas que tengan entre 10 a 150 UFC, para disminuir el error en la cuenta.
Procedimientos de control de calidad	No aplica
Interferencias	No aplica
Principios del procedimiento para el cálculo de resultados	Después de haber realizado el conteo de las colonias en las placas se deberá multiplicar el resultado del conteo por el factor de dilución que en este caso podrá ser 10, 100, 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , etc. Para poder determinar el número de UFC/ mL o gr de muestra.
Intervalos de referencia biológica o valores de decisión clínica	<10 UFC/mL *Los criterios microbiológicos reportados en este formato, tienen un carácter orientativo y corresponden a la NOM-093-SSA1-1994 la cuál ha sido cancelada y sustituida por la NOM-251-SSA1-2009 “Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios”, en la cual no se anexan dichos criterios. Por lo tanto la interpretación de los límites microbiológicos en los resultados emitidos por el Laboratorio, quedan a criterio y responsabilidad del solicitante.
Intervalo reportable de los resultados del examen	No aplica
Instrucciones para determinar los resultados cuantitativos	No aplica
Valores de alerta o críticos	No aplica
Interpretación clínica del laboratorio	El realizar la cuenta en placa nos permite evaluar los mohos y levaduras viables en las muestras de alimentos o incluso en los

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

	equipos utilizados para su manejo, indicando probable contaminación o una mala sanitización.
Fuentes potenciales de variación	La temperatura de la incubadora debe permanecer en 25 ± 1 °C, ya que puede ser una fuente de variabilidad en el crecimiento de los microorganismos, también se puede dejar a temperatura ambiente.
Referencias	NOM-251-SSA1-2009 “Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios” NOM-111-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

	MANUAL		Identificación: MAN-MIC-02
	MICROBIOLOGÍA SANITARIA		Versión: 2
			Fecha creación: 11/Enero/2018
			Fecha actualización: 02/Julio/2020

DETERMINACION DE MOHOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS



	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

RETO MICROBIANO POR MICRODILUCIÓN	
Propósito del examen	Determinar la actividad antimicrobiana de una solución demostrando el porcentaje de reducción de un número determinado de microorganismos cuando se pone en contacto con la solución antimicrobiana, bajo ciertas condiciones de prueba en específico.
Principio y método del procedimiento utilizado para el examen	Dado que el mecanismo de acción de los productos desinfectantes varía, su efecto no es necesariamente el mismo en diferentes microorganismos. Si una industria quiere garantizar la efectividad de un producto bactericida, el porcentaje de reducción microbiana se determina en la prueba comúnmente llamada "reto microbiano". Esta prueba consiste en inocular una suspensión de cantidad conocida de los microorganismos de prueba en el producto bactericida, dejar un período de contacto de 30 segundos una vez pasado el tiempo se agrega una solución neutralizante, que detenga el efecto germicida y luego se inocula la mezcla en un medio de cultivo para contar el número de bacterias que lograron sobrevivir. Cuando se leen los resultados, se comparan con la cantidad de microorganismos inoculados inicialmente y el porcentaje de reducción obtenido, con el que se puede determinar la efectividad del agente bactericida.
Características de desempeño	No aplica
Tipo de muestra	Soluciones bactericidas, agentes antimicrobianos, detergentes, soluciones asépticas, etc. Las soluciones deben de estar a la concentración a la cual está indicado para su uso, en caso contrario se debe indicar cuál es la concentración a la cual se quiere probar y cuál es el diluyente necesario para realizar la dilución.

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

Preparación del paciente	No aplica
Tipo de contenedor y aditivos	Ver MAN-TM-01
Equipo y reactivos requeridos	Incubadora Mechero Balanza analítica Autoclave Baño maría Matraz Erlenmeyer Parrilla eléctrica con agitador magnético Agitador magnético Propipetero Pipetas Micropipetas Puntillas para micropipetas Vasos de vidrio Agar para métodos estándar Agar para métodos estándar con neutralizante Agar nutritivo Solución amortiguadora de fosfatos 0.25M (concentrada) Solución neutralizante o Buffer neutralizante Lecitina de soya Polisorbato 80 (tween 80)
Controles ambientales y de seguridad	El personal del área debe utilizar los implementos de bioseguridad como son: bata de laboratorio, guantes, lentes de seguridad y cubre bocas cuando sean manejadas las muestras microbiológicas. Los cultivos generados en el procedimiento son considerados biológico-infecciosos y deben depositarse en bolsa roja,

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

	previamente identificada como cepas y cultivos. Ref. MAN-SH-01, MAN-RPBI-01.
Procedimientos de calibración	No aplica
Pasos del procedimiento	Preparación de soluciones y reactivos - Solución neutralizante concentrada Mezclar 40 gr de lecitina de soya, 280 mL de polisorbato 80 (tween 80) y 1.25 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.25M (solución madre o concentrada). Disolver todo en 500 mL de agua destilada y ajustar el pH a 7.2 con soluciones concentradas de NaOH y HCl. Una vez regulado el pH se debe llevar la mezcla hasta un volumen final de 1L. distribuir en porciones de 100 mL y esterilizar en autoclave a 15 psi, a 121°C durante 20 min. - Solución neutralizante diluida Mezclar 100 mL de la solución neutralizante concentrada con 2.5 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.25M (solución madre o concentrada) y agregar 1675 mL de agua destilada, se mezcla bien y se distribuye en porciones de 9 mL en tubos de rosca y se esterilizan en autoclave a 15 psi, a 121°C por 20 min. - Buffer neutralizante Este buffer puede sustituir a la solución neutralizante y se prepara de acuerdo a las indicaciones del fabricante - Agar para métodos estándar con neutralizante El agar para métodos estándar se prepara de acuerdo a las indicaciones del fabricante y se agrega 25 ml de la solución neutralizante concentrada por cada litro de agar que se prepare. En caso de que se compre el medio con el neutralizante incluido este se debe prepara de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

	Preparación y acondicionamiento de la muestra • Microorganismos de prueba Los microorganismos de prueba deben de conservarse en condiciones que no se altere su bioquímica y viabilidad de las cepas de acuerdo a los estándares del laboratorio. Los microorganismos de prueba deben sembrarse 24 hrs antes de su uso en un tubo con agar inclinado (agar nutritivo, TSA o BHI) a 37°C y mantenerlos posteriormente en refrigeración. • Preparación del inóculo inicial Antes de realizar la prueba se deben de realizar 2 resiembras de las cepas a probar, incubándolas durante 24 hrs a 37°C y verificar que sea un cultivo axénico. A partir del cultivo de la segunda resiembra se debe inocular una placa de agar (nutritivo, TSA o BHI) por el método masivo o inocular un tubo con agar inclinado durante 24 hrs a 37°C. Después se remueve el crecimiento bacteriano del paso anterior y se mezcla en tubos con solución salina estéril hasta obtener una suspensión bacteriana igual a la escala 10 de McFarland o que leída a una longitud de onda de 580 nm de una lectura de 3 a 5 % de transmitancia (suspensión de 75 a 125 X 10⁸ UFC/mL). Procedimiento del reto microbiano • Determinación de la cuenta viable inicial En un tubo con 9 mL de solución amortiguadora de fosfatos, transferir 1 mL de la suspensión bacteriana de prueba y realizar a partir de esta solución (1:10) realizar diluciones decimales por la técnica de microdilución utilizando tubos Eppendorf que contengan 900 µL de solución amortiguadora de fosfatos estéril, transferir 100 µL de la dilución anterior y mezclar bien con la micropipeta, repetir hasta obtener la dilución 1 X 10⁻⁹ o la dilución necesaria para obtener en la placa gotas con 3 a 7 colonias.
--	---

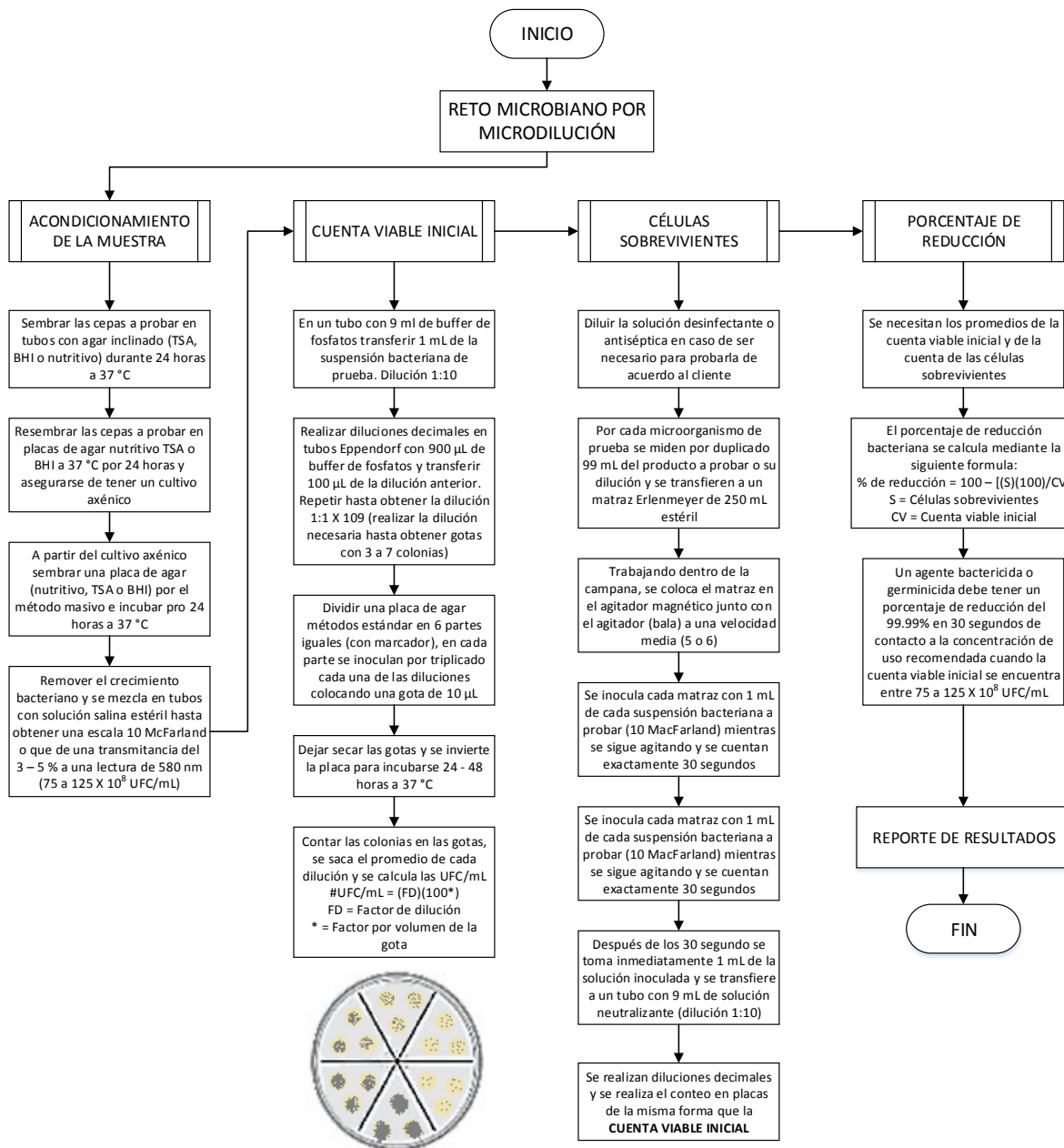
	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

	En placas de agar para métodos estándar se divide la placa en 6 partes iguales y en cada parte se inocula por triplicado cada una de las diluciones realizadas colocando una gota de exactamente 10 μL. Se dejan secar por completo todas las gotas y se invierten para incubarse a 37°C durante 24 – 48 hrs. Después se realiza el conteo de las colonias en las gotas inoculadas y se calcula las UFC/mL tomando en cuenta el factor de dilución y el volumen de inoculación. • Determinación de las células sobrevivientes Si es necesario primero se prepara la dilución con agua o el solvente necesario para poder probar el agente antimicrobiano. Para cada microorganismo de prueba se mide exactamente por duplicado 99 mL del agente antimicrobiano o su dilución y se transfiere a matraces Erlenmeyer de 250 mL con tapón estériles. El matraz con el agente antimicrobiano se coloca en el agitador magnético y se coloca el agitador magnético a una velocidad media. Inocular cada uno de los matraces con 1 mL de cada uno de los inóculos iniciales de cada microorganismo a probar mientras se sigue agitando la solución y exactamente 30 seg después de la inoculación, tomar 1 mL de la solución inoculada y transferirlo a un tubo que contenga 9 mL de solución neutralizante y se mezcla bien. Se realizan diluciones decimales y se inoculan en placas de agar para métodos estándar con neutralizante de igual manera que en la determinación de la cuenta viable inicial. Se incuban las placas de agar a 37°C durante 24 – 48 hrs. después se cuentan las colonias en las gotas inoculadas y se calcula las UFC/mL tomando en cuenta el factor de dilución y el volumen de inoculación.
Procedimientos de control de calidad	No aplica
Interferencias	No aplica

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

Principios del procedimiento para el cálculo de resultados	Para determinar el porcentaje de reducción se debe promediar los resultados de la cuenta viable inicial y de la cuenta de las células sobrevivientes y se calcula el % de reducción mediante la siguiente formula: % de reducción = $100 - [(S \times 100)/C.V.]$ S: Células sobrevivientes UFC/mL C.V.: Cuenta viable inicial UFC/mL
Intervalos de referencia biológica o valores de decisión clínica	Un germicida debe tener un porcentaje de reducción de 99.99%.
Intervalo reportable de los resultados del examen	No aplica
Instrucciones para determinar los resultados cuantitativos	No aplica
Valores de alerta o críticos	No aplica
Interpretación clínica del laboratorio	Un germicida debe tener un porcentaje de reducción de la cuenta bacteriana de 99.99% en 30 seg de contacto a la concentración de uso recomendado, cuando la cuenta viable inicial se encuentra entre 75 a 125×10^8 UFC/mL
Fuentes potenciales de variación	La temperatura de la incubadora debe permanecer en 37 ± 1 °C, ya que puede ser una fuente de variabilidad en el crecimiento de los microorganismos.
Referencias	NMX-BB-040-SCFI-1999, Métodos generales de análisis. Determinación de la actividad antimicrobiana en productos germicidas.

	MANUAL		Identificación: MAN-MIC-02
	MICROBIOLOGÍA SANITARIA		Versión: 2
			Fecha creación: 11/Enero/2018
			Fecha actualización: 02/Julio/2020



	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 2
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 02/Julio/2020

HISTORIAL DE REVISIONES

No. Versión	No. Revisión	Descripción de la Revisión	Fecha de Revisión
0	0	Liberado	11/Enero/2018
1	1	Se anexaron las especificaciones de preparación del paciente, tipo de contenedor y aditivos, instrucciones para determinar los resultados cuantitativos, se acomodó el manual conforme los requerimientos en el apartado 5.5.3 de la norma NMX-EC-15189-IMNC-2015	13/Mayo/2019
2	2	Se agregó el procedimiento del reto microbiano. Revisión anual de documentos	02/Julio/2020