

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 0
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 11/Enero/2018

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: 0
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 11/Enero/2018

Contenido

CUENTA DE BACTERIAS 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.....	21
HISTORIAL DE REVISIONES.....	27

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 0
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 11/Enero/2018

CUENTA DE BACTERIAS 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 de la muestra bajo estudio.
Principio del procedimiento utilizado para exámenes	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 inicial con una dilución primaria con el objeto de distribuir los más uniformemente posible los microorganismos contenidos en la muestra destinada para el análisis. Agregando reactivos como el TTC el cual sirve como indicador por medio de la utilización de la glucosa dando a las colonias un vire de color rojo las cuales serna contadas sin importar tamaño, o intensidad de color en un rango óptimo de 25 a 250 UFC/ml.
Especificaciones de desempeño	No aplica
Sistema de muestra primaria	Alimentos Se tomaran con las pinzas utilizadas para su distribución, y se colocaran en bolsas o recipientes estériles para su transporte al laboratorio.
Tipo de contenedor y aditivos	Recipiente estéril de boca ancha, con cierre hermético o bolsa estéril de 4 o 7 onzas.
Equipo y reactivos requeridos	Incubadora Mechero Balanza granataría Balanza analítica

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 0
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 11/Enero/2018

	Autoclave Baño maría Matraz Erlenmeyer Parrilla eléctrica Propipetero Pipetas Vasos de vidrio Abatelenguas Reactivos Agar para métodos estándar (triptona-extracto de levadura) Cloruro de trifeniltetrazolio (TTC)
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. 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.



MANUAL

MICROBIOLOGÍA SANITARIA

Identificación: MAN-MIC-02
Versión: 0
Fecha creación: 11/Enero/2018
Fecha actualización: 11/Enero/2018

- 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, 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, 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

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 0
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 11/Enero/2018

	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 24 h. 10) Seleccionar aquellas cajas que tengan entre 25 a 250 UFC, para disminuir el error en la cuenta.
Procedimientos de control de calidad	No exceder más de 20 minutos de tiempo desde que se colocó el diluyente al alimento hasta que se adiciona en las cajas con medio de cultivo.
Interferencias	No aplica
Principios del procedimiento para el cálculo de resultados	No aplica
Intervalos biológicos de resultados	<150,000 UFC/ml
Intervalo de los resultados del examen factible de ser informado	No aplica
Valores de alerta	No aplica
Interpretación por el 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.

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 0
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 11/Enero/2018

Precauciones 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.
Fuentes potenciales de variabilidad	La temperatura de la incubadora debe permanecer entre 35° y 38°C, ya que puede ser una fuente de variabilidad en el crecimiento de los microorganismos.



MANUAL

MICROBIOLOGÍA SANITARIA

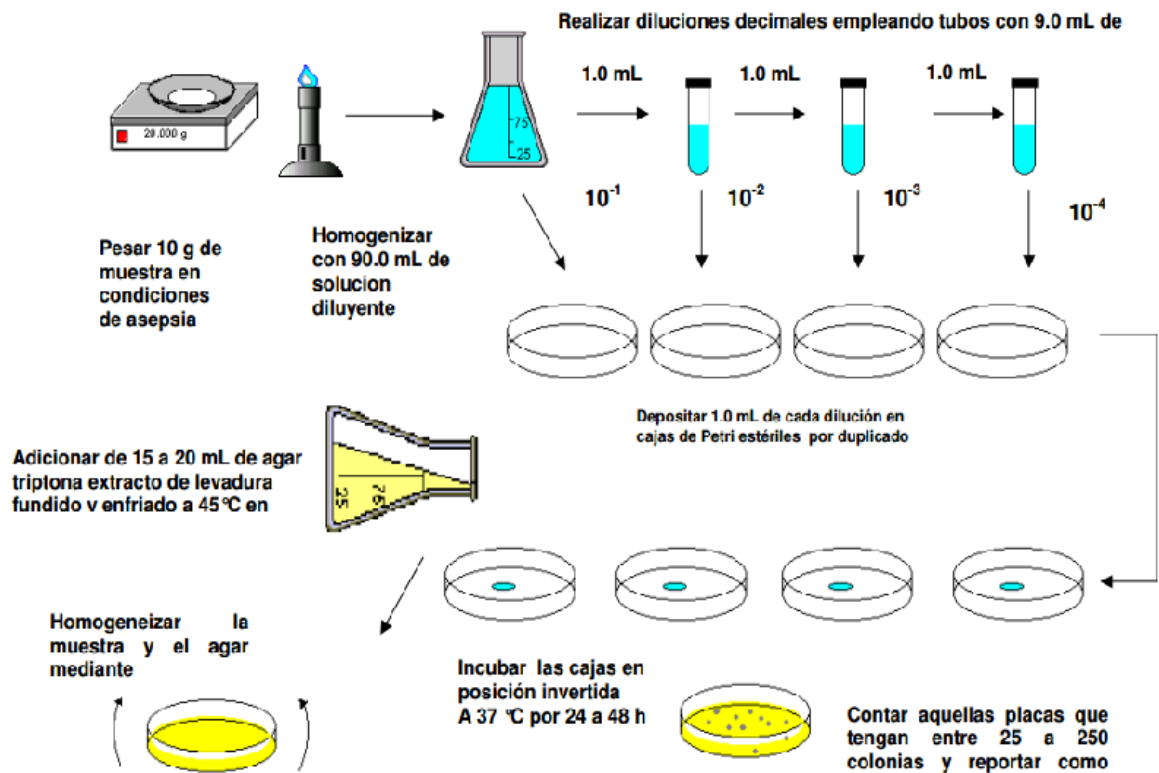
Identificación:
MAN-MIC-02

Versión: **0**

Fecha creación:
11/Enero/2018

Fecha actualización:
11/Enero/2018

CUENTA EN PLACA DE BACTERIAS



	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 0
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 11/Enero/2018

CUENTA DE BACTERIAS COLIFORMES TOTALES EN PLACA	
Propósito del examen	El grupo de los microorganismos coliformes es el más ampliamente utilizado en microbiología de los alimentos como indicador de prácticas higiénicas adecuadas, el método permite determinar el número de microorganismos coliformes presentes en una muestra, utilizando un medio selectivo (Agar de bilis rojo y violeta).
Principio del procedimiento utilizado para exámenes	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.
Especificaciones de desempeño	No aplica
Sistema de muestra primaria	Alimentos Se tomaran con las pinzas utilizadas para su distribución, y se colocaran en bolsas o recipientes estériles para su transporte al laboratorio.

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 0
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 11/Enero/2018

Tipo de contenedor y aditivos	Recipiente estéril de boca ancha, con cierre hermético o bolsa estéril de 4 o 7 onzas.
Equipo y reactivos requeridos	Incubadora Mechero Balanza granataría Balanza analítica Autoclave Baño maría Matraz Erlenmeyer Parrilla eléctrica Propipetero Pipetas Vasos de vidrio Abatelenguas Reactivos Agar de bilis y rojo violeta
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. 4) Todo material que tendrá contacto con las muestras o los microorganismos deberán estar previamente estériles.



MANUAL

MICROBIOLOGÍA SANITARIA

Identificación: MAN-MIC-02
Versión: 0
Fecha creación: 11/Enero/2018
Fecha actualización: 11/Enero/2018

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, en el caso de aguas preparadas se tomara 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 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 $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 h.
- 7) Seleccionar aquellas cajas que tengan entre 25 a 250 UFC, para disminuir el error en la cuenta.

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 0
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 11/Enero/2018

Procedimientos de control de calidad	No exceder más de 20 minutos de tiempo desde que se colocó el diluyente al alimento hasta que se adiciona en las cajas con medio de cultivo.
Interferencias	No aplica
Principios del procedimiento para el cálculo de resultados	No aplica
Intervalos biológicos de resultados	<10 totales en muestras sólidas y semisólidas. <100 totales en aguas preparadas.
Intervalo de los resultados del examen factible de ser informado	No aplica
Valores de alerta	No aplica
Interpretación por el 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.

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 0
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 11/Enero/2018

Precauciones 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.
Fuentes potenciales de variabilidad	La temperatura de la incubadora debe permanecer entre 35° y 38°C, ya que puede ser una fuente de variabilidad en el crecimiento de los microorganismos.



MANUAL

MICROBIOLOGÍA SANITARIA

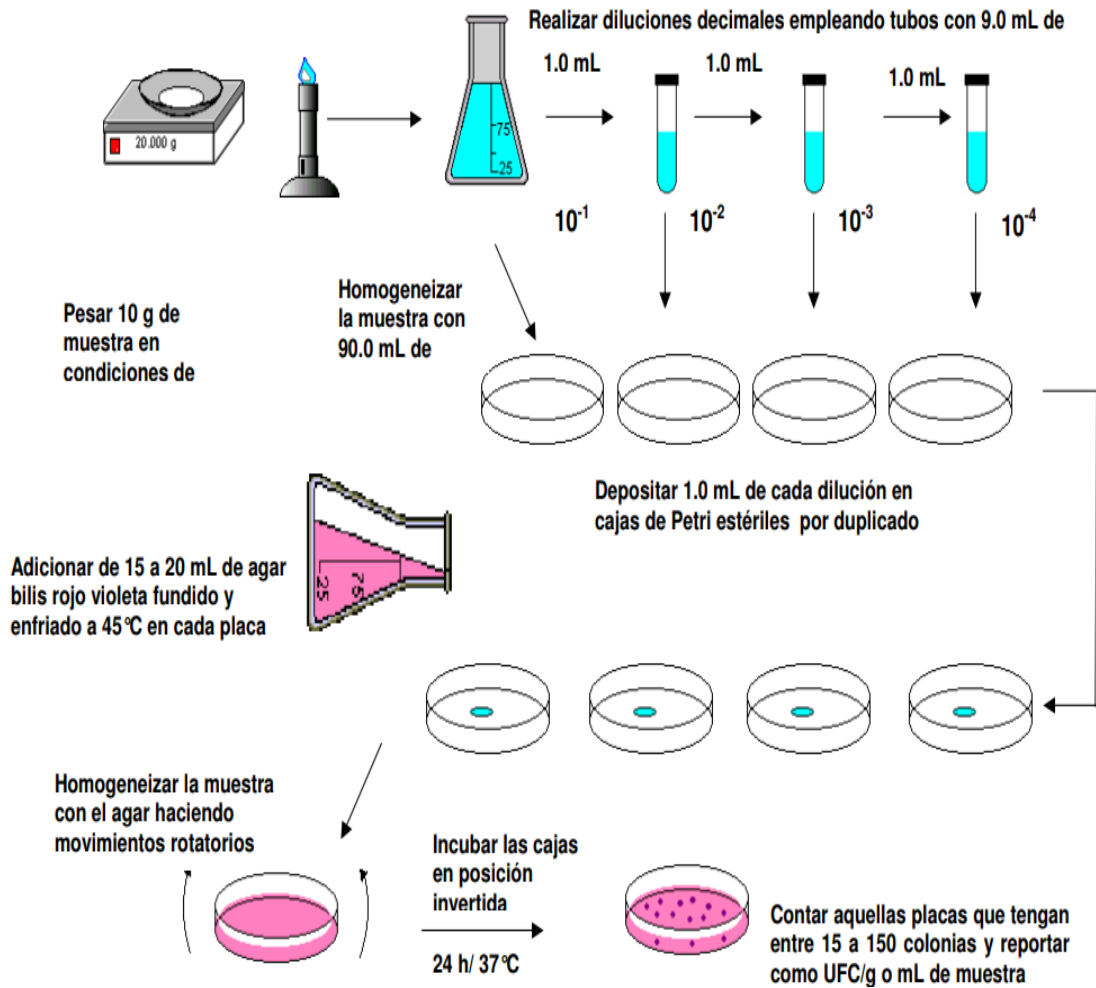
Identificación:
MAN-MIC-02

Versión: **0**

Fecha creación:
11/Enero/2018

Fecha actualización:
11/Enero/2018

DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES POR CUENTA EN PLACA



	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 0
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 11/Enero/2018

DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES. TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE.	
Propósito del examen	Las bacterias coliformes son un grupo heterogéneo compuesto por varios. Existe poca evidencia que indique que estas bacterias coliformes pertenezcan a un solo género taxonómico. El método se basa en que las bacterias coliformes fermentan la lactosa, produciendo ácido y gas el cual se manifiesta en campanas de fermentación.
Principio del procedimiento utilizado para exámenes	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 termoresistentes.
Especificaciones de desempeño	No aplica
Sistema de muestra primaria	Alimentos. Se tomaran con las pinzas utilizadas para su distribución, y se colocaran en bolsas o recipientes estériles para su transporte al laboratorio. Agua. Se tomara en vaso estériles, limpiando con alcohol al 70% y una gasa la llave de la tarja y se deja correr por 5 a 10 segundo el

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 0
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 11/Enero/2018

	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.
Tipo de contenedor y aditivos	Recipiente estéril de boca ancha, con cierre hermético o bolsa estéril de 4 o 7 onzas.
Equipo y reactivos requeridos	Incubadora Mechero Balanza granataría Balanza analítica Autoclave Baño maría Matraz Erlenmeyer Parrilla eléctrica Propipetero Pipetas Vasos de vidrio Abatelenguas Campanas de durham Tubos de cultivo Reactivos Caldo lauril sulfato de sodio Caldo lactosa luril verde brillante Caldo para <i>Escherichia coli</i> (EC)
Procedimientos de calibración	No aplica

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 0
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 11/Enero/2018

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. 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 mesofilicos en placa, e inocular los primeros tres tubos agregando 1 mL de muestra
---	---

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 0
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 11/Enero/2018

	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.
Procedimientos de control de calidad	No exceder más de 20 minutos de tiempo desde que se colocó el diluyente al alimento hasta que se adiciona en las cajas con medio de cultivo.
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 los cuadros correspondientes ubicados en el manual de la NOM-112-SSA1-1994.
Intervalos biológicos de resultados	<3 fecales.

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 0
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 11/Enero/2018

Intervalo de los resultados del examen factible de ser informado	No aplica
Valores de alerta	No aplica
Interpretación por el 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.
Precauciones 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.
Fuentes potenciales de variabilidad	La temperatura de la incubadora debe permanecer entre 35° y 38°C, ya que puede ser una fuente de variabilidad en el crecimiento de los microorganismos. Mantener la temperatura del baño de agua estable ya que de este dependerá la presencia de los coliformes termo-resistentes.



MANUAL

MICROBIOLOGÍA SANITARIA

Identificación:
MAN-MIC-02

Versión: 0

Fecha creación:
11/Enero/2018

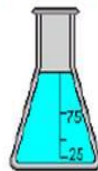
Fecha actualización:
11/Enero/2018

DETERMINACIÓN DEL NMP DE COLIFORMES EN MUESTRAS SÓLIDAS O ALIMENTOS

Pesar 10.0 g de muestra
en condiciones de asepsia



Homogenizar la muestra
con 90.0 mL de solución diluyente



1.0 mL



Realizar 2 diluciones decimales más en
tubos con 9.0 mL de solución diluyente

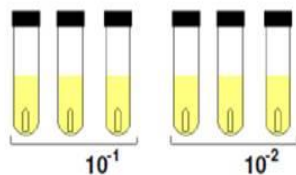


Sembrar por triplicado
cada dilución en tubos
de caldo lauril sulfato de
sodio (1X)

10^{-1}

10^{-2}

10^{-3}



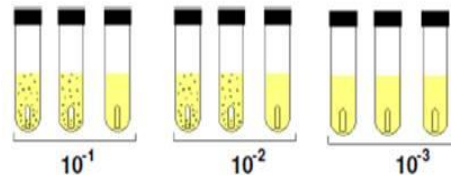
10^{-1}

10^{-2}

10^{-3}

35 °C

24 - 48 h



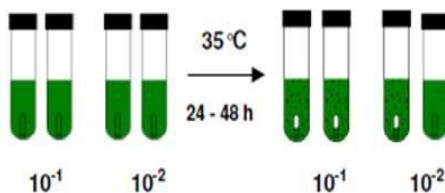
10^{-1}

10^{-2}

10^{-3}

Tubos con 10.0 mL de CLSS concentración
sencilla (1X) + 1.0 mL de muestra

Siembra con asa bacteriológica de los tubos
positivos (producción de gas) en caldo lactosa
verde brillante bilis 2% y caldo EC



10^{-1}

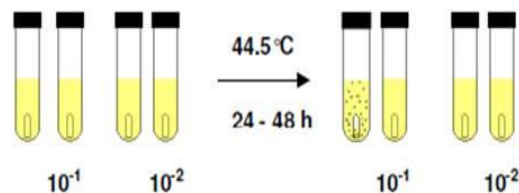
10^{-2}

10^{-1}

10^{-2}

Tubos con 10.0 mL de
Caldo Lactosa verde
brillante bilis 2%

Lectura de tubos positivos en
tablas. **NMP de coliformes
totales /g de muestra**



10^{-1}

10^{-2}

10^{-1}

10^{-2}

Tubos con 10.0 mL de
Caldo EC o EC-MUG

Lectura de tubos positivos en
tablas. **NMP de coliformes
fecales /g de muestra.**
Siembra de tubos positivos en
agar Mac Conkey para
búsqueda de *Escherichia coli*

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 0
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 11/Enero/2018

CUENTA DE MOHOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS

Propósito del 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. El método se basa en inocular una muestra conocida en un medio selectivo específico, acidificado a un pH de 3,5 e incubando a temperaturas de 25°C dando como resultado colonias características de estos microorganismos.
Principio del procedimiento utilizado para exámenes	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 ácidos 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: 0
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 11/Enero/2018

Especificaciones de desempeño	No aplica
Sistema de muestra primaria	Alimentos Se tomaran con las pinzas utilizadas para su distribución, y se colocaran en bolsas o recipientes estériles para su transporte al laboratorio.
Tipo de contenedor y aditivos	Recipiente estéril de boca ancha, con cierre hermético o bolsa estéril de 4 o 7 onzas.
Equipo y reactivos requeridos	Incubadora Mechero Balanza granataría Balanza analítica Autoclave Baño maría Matraz Erlenmeyer Parrilla eléctrica Propipetero Pipetas Vasos de vidrio Abatelenguas Reactivos Agar papa dextrosa (PDA) Acido tartárico 10%
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



MANUAL

MICROBIOLOGÍA SANITARIA

Identificación: MAN-MIC-02
Versión: 0
Fecha creación: 11/Enero/2018
Fecha actualización: 11/Enero/2018

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 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.

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 0
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 11/Enero/2018

	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. Seleccionar aquellas cajas que tengan entre 10 a 150 UFC, para disminuir el error en la cuenta.
Procedimientos de control de calidad	No exceder más de 20 minutos de tiempo desde que se colocó el diluyente al alimento hasta que se adiciona en las cajas con medio de cultivo.
Interferencias	No aplica

	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 0
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 11/Enero/2018

Principios del procedimiento para el cálculo de resultados	No aplica
Intervalos biológicos de resultados	<10 UFC/mL
Intervalo de los resultados del examen factible de ser informado	No aplica
Valores de alerta	No aplica
Interpretación por el laboratorio	El realizar la cuenta en placa nos permite evaluar los mohos y levaduras viables en las muestras de alimentos o incluso en los equipos utilizados para su manejo, indicando probable contaminación o una mala sanitización.
Precauciones 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.
Fuentes potenciales de variabilidad	La temperatura de la incubadora debe permanecer entre 25° y 28°C, ya que puede ser una fuente de variabilidad en el crecimiento de los microorganismos, también se puede dejar a temperatura ambiente.



MANUAL

MICROBIOLOGÍA SANITARIA

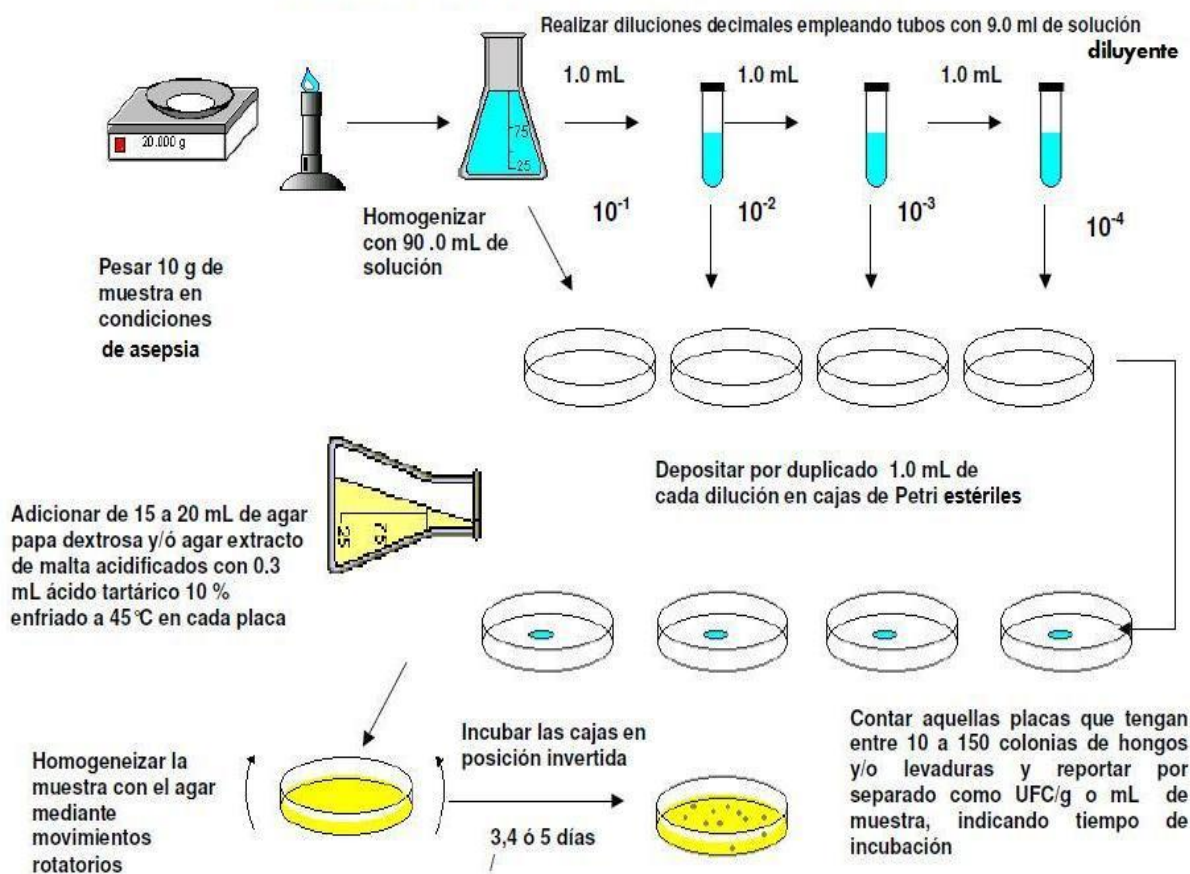
Identificación:
MAN-MIC-02

Versión: **0**

Fecha creación:
11/Enero/2018

Fecha actualización:
11/Enero/2018

DETERMINACION DE MOHOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS



	MANUAL MICROBIOLOGÍA SANITARIA	Identificación: MAN-MIC-02
		Versión: 0
		Fecha creación: 11/Enero/2018
		Fecha actualización: 11/Enero/2018

HISTORIAL DE REVISIONES

No. Revisión	No. Versión	Descripción de la Revisión	Fecha de Revisión