

	<b>MANUAL</b>	Identificación: <b>MAN-MIC-02</b>
	<b>MICROBIOLOGÍA SANITARIA</b>	Versión: <b>1</b>
		Fecha creación: <b>11/Enero/2018</b>
		Fecha actualización: <b>13/Mayo/2019</b>

# 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			

	<b>MANUAL</b>	<b>Identificación:</b> MAN-MIC-02
	<b>MICROBIOLOGÍA SANITARIA</b>	<b>Versión:</b> 1
		<b>Fecha creación:</b> 11/Enero/2018
		<b>Fecha actualización:</b> 13/Mayo/2019

## 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 .....	23
HISTORIAL DE REVISIONES.....	30

OBSOLETO

	<b>MANUAL</b>	<b>Identificación:</b> MAN-MIC-02
	<b>MICROBIOLOGÍA SANITARIA</b>	<b>Versión:</b> 1
		<b>Fecha creación:</b> 11/Enero/2018
		<b>Fecha actualización:</b> 13/Mayo/2019

<b>CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA</b>	
<b>Propósito del examen</b>	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.
<b>Principio y método del procedimiento utilizado para el examen</b>	<p>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).</p> <p>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.</p> <p>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.</p>
<b>Características de desempeño</b>	No aplica
<b>Tipo de muestra</b>	Alimentos Se tomaran con las pinzas utilizadas para su distribución, y se colocaran en bolsas o recipientes estériles para su transporte al laboratorio.
<b>Preparación del paciente</b>	No aplica
<b>Tipo de contenedor y aditivos</b>	Ver MAN-TM-01
<b>Equipo y reactivos requeridos</b>	Incubadora Mechero Balanza granataría



# MANUAL

## MICROBIOLOGÍA SANITARIA

<b>Identificación:</b> MAN-MIC-02
<b>Versión:</b> 1
<b>Fecha creación:</b> 11/Enero/2018
<b>Fecha actualización:</b> 13/Mayo/2019

	<p>Balanza analítica</p> <p>Autoclave</p> <p>Baño maría</p> <p>Matraz Erlenmeyer</p> <p>Parrilla eléctrica</p> <p>Propipetero</p> <p>Pipetas</p> <p>Vasos de vidrio</p> <p>Abatelenguas</p> <p>Reactivos</p> <p>Agar para métodos estándar (triptona-extracto de levadura)</p> <p>Cloruro de trifeniltetrazolio (TTC)</p>
<b>Controles ambientales y de seguridad</b>	<p>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.</p> <p>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.</p>
<b>Procedimientos de calibración</b>	<p>No aplica</p>
<b>Pasos del procedimiento</b>	<p>Preparación del medio de cultivo.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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.</li> <li>2) Una vez homogéneo se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.</li> </ol>



# MANUAL

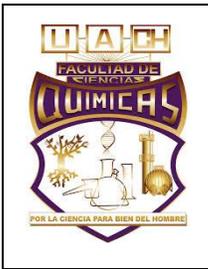
## MICROBIOLOGÍA SANITARIA

<b>Identificación:</b> MAN-MIC-02
<b>Versión:</b> 1
<b>Fecha creación:</b> 11/Enero/2018
<b>Fecha actualización:</b> 13/Mayo/2019

- 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 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.



# MANUAL

## MICROBIOLOGÍA SANITARIA

<b>Identificación:</b> MAN-MIC-02
<b>Versión:</b> 1
<b>Fecha creación:</b> 11/Enero/2018
<b>Fecha actualización:</b> 13/Mayo/2019

	<p>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.</p> <p>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.</p> <p>9) Incubar las cajas a temperatura de <math>35 \pm 2^\circ\text{C}</math> durante 24 h.</p> <p>10) Seleccionar aquellas cajas que tengan entre 25 a 250 UFC, para disminuir el error en la cuenta.</p>
<b>Procedimientos de control de calidad</b>	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.
<b>Interferencias</b>	No aplica
<b>Principios del procedimiento para el cálculo de resultados</b>	No aplica
<b>Intervalos de referencia biológica o valores de decisión clínica</b>	<b>&lt;150,000 UFC/ml</b> *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.

	<b>MANUAL</b>	<b>Identificación:</b> MAN-MIC-02
	<b>MICROBIOLOGÍA SANITARIA</b>	<b>Versión:</b> 1
		<b>Fecha creación:</b> 11/Enero/2018
		<b>Fecha actualización:</b> 13/Mayo/2019

<b>Intervalo reportable de los resultados del examen</b>	No aplica
<b>Instrucciones para determinar los resultados cuantitativos</b>	Se determina mediante las diluciones realizadas a dicha muestra y se cuantifican las cajas que contengan entre 25 y 250 UFC/mL.
<b>Valores de alerta o críticos</b>	No aplica
<b>Interpretación clínica del laboratorio</b>	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.
<b>Fuentes potenciales de variación</b>	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.
<b>Referencias</b>	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 bacterias aerobias en placa”



# MANUAL

## MICROBIOLOGÍA SANITARIA

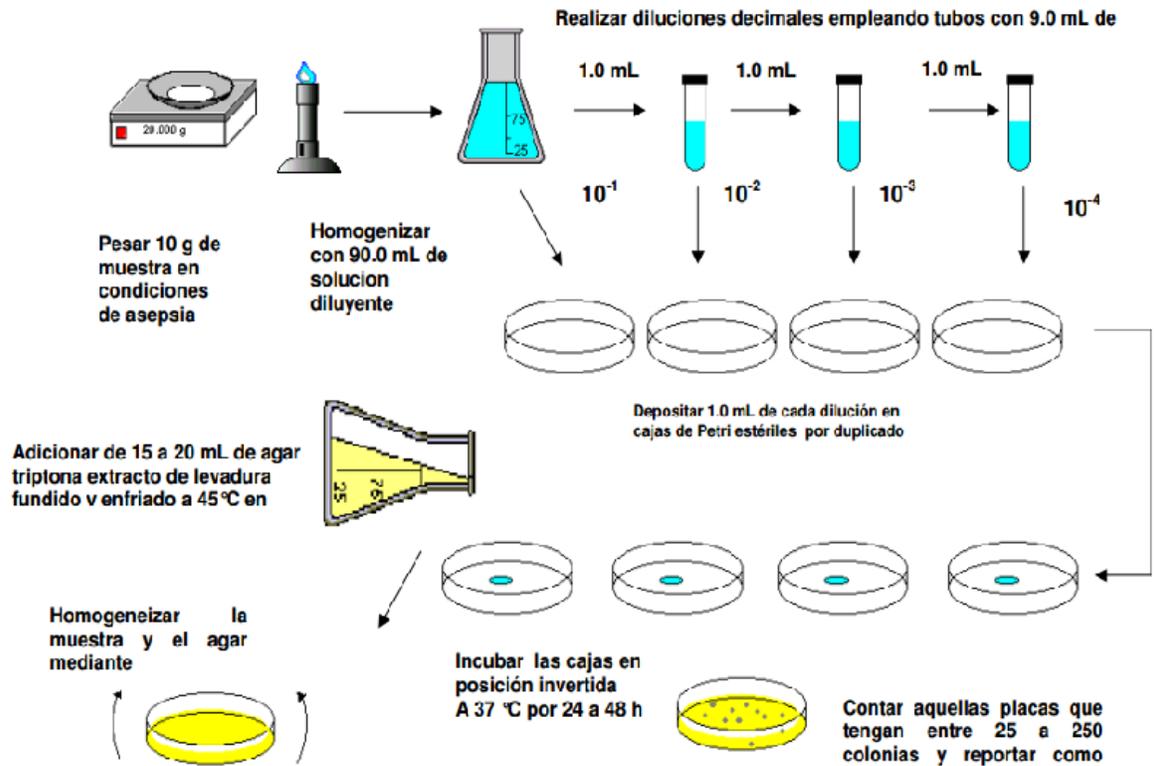
Identificación:  
**MAN-MIC-02**

Versión: **1**

Fecha creación:  
**11/Enero/2018**

Fecha actualización:  
**13/Mayo/2019**

### CUENTA EN PLACA DE BACTERIAS



	<b>MANUAL</b>  <b>MICROBIOLOGÍA</b> <b>SANITARIA</b>	<b>Identificación:</b> <b>MAN-MIC-02</b>
		<b>Versión:</b> 1
		<b>Fecha creación:</b> <b>11/Enero/2018</b>
		<b>Fecha actualización:</b> <b>13/Mayo/2019</b>

<b>CUENTA DE BACTERIAS COLIFORMES TOTALES EN PLACA</b>	
<b>Propósito del examen</b>	<p>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).</p>
<b>Principio y método del procedimiento utilizado para el examen</b>	<p>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).</p> <p>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.</p>
<b>Características de desempeño</b>	<p>No aplica</p>
<b>Tipo de muestra</b>	<p>Alimentos</p> <p>Se tomaran con las pinzas utilizadas para su distribución, y se colocaran en bolsas o recipientes estériles para su transporte al laboratorio.</p>

	<b>MANUAL</b>	<b>Identificación:</b> MAN-MIC-02
	<b>MICROBIOLOGÍA SANITARIA</b>	<b>Versión:</b> 1
		<b>Fecha creación:</b> 11/Enero/2018
		<b>Fecha actualización:</b> 13/Mayo/2019

<b>Preparación del paciente</b>	No aplica
<b>Tipo de contenedor y aditivos</b>	Ver MAN-TM-01
<b>Equipo y reactivos requeridos</b>	<p>Incubadora</p> <p>Mechero</p> <p>Balanza granataría</p> <p>Balanza analítica</p> <p>Autoclave</p> <p>Baño maría</p> <p>Matraz Erlenmeyer</p> <p>Parrilla eléctrica</p> <p>Propipetero</p> <p>Pipetas</p> <p>Vasos de vidrio</p> <p>Abatelenguas</p> <p>Reactivos</p> <p>Agar de bilis y rojo violeta</p>
<b>Controles ambientales y de seguridad</b>	<p>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.</p> <p>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.</p>
<b>Procedimientos de calibración</b>	No aplica



# MANUAL

## MICROBIOLOGÍA SANITARIA

Identificación:

MAN-MIC-02

Versión: 1

Fecha creación:

11/Enero/2018

Fecha actualización:

13/Mayo/2019

### 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, 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

	<b>MANUAL</b>	<b>Identificación:</b> MAN-MIC-02
	<b>MICROBIOLOGÍA SANITARIA</b>	<b>Versión:</b> 1
		<b>Fecha creación:</b> 11/Enero/2018
		<b>Fecha actualización:</b> 13/Mayo/2019

	<p>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.</p> <p>6) Incubar las cajas a temperatura de <math>35 \pm 2^{\circ}\text{C}</math> durante 24 h.</p> <p>7) Seleccionar aquellas cajas que tengan entre 25 a 250 UFC, para disminuir el error en la cuenta.</p>
<b>Procedimientos de control de calidad</b>	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.
<b>Interferencias</b>	No aplica
<b>Principios del procedimiento para cálculo de resultados</b>	No aplica
<b>Intervalos de referencia biológica o valores de decisión clínica</b>	<p>&lt;10 totales en muestras sólidas y semisólidas.</p> <p>&lt;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.</p>
<b>Intervalo reportable de los resultados del examen</b>	No aplica

	<b>MANUAL</b>	<b>Identificación:</b> MAN-MIC-02
	<b>MICROBIOLOGÍA SANITARIA</b>	<b>Versión:</b> 1
		<b>Fecha creación:</b> 11/Enero/2018
		<b>Fecha actualización:</b> 13/Mayo/2019

<b>Instrucciones para determinar los resultados cuantitativos</b>	Se determina mediante las diluciones realizadas a dicha muestra y se cuantifican las cajas que contengan entre 15 y 150 UFC/mL.
<b>Valores de alerta o críticos</b>	No aplica
<b>Interpretación clínica del laboratorio</b>	<p>El uso de coliformes como indicador sanitario puede aplicarse para:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• La detección de prácticas sanitarias deficientes en el manejo y en la fabricación de los alimentos.</li> <li>• La evolución de la calidad microbiológica de un producto, aunque su presencia no necesariamente implica un riesgo sanitario.</li> <li>• Evaluación de la eficiencia de prácticas sanitarias e higiénicas del equipo.</li> <li>• La demostración y la cuenta de microorganismos coliformes, puede realizarse mediante el empleo de medios de cultivo sólidos con características diferenciales o selectivas.</li> </ul>
<b>Fuentes potenciales de variación</b>	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.
<b>Referencias</b>	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

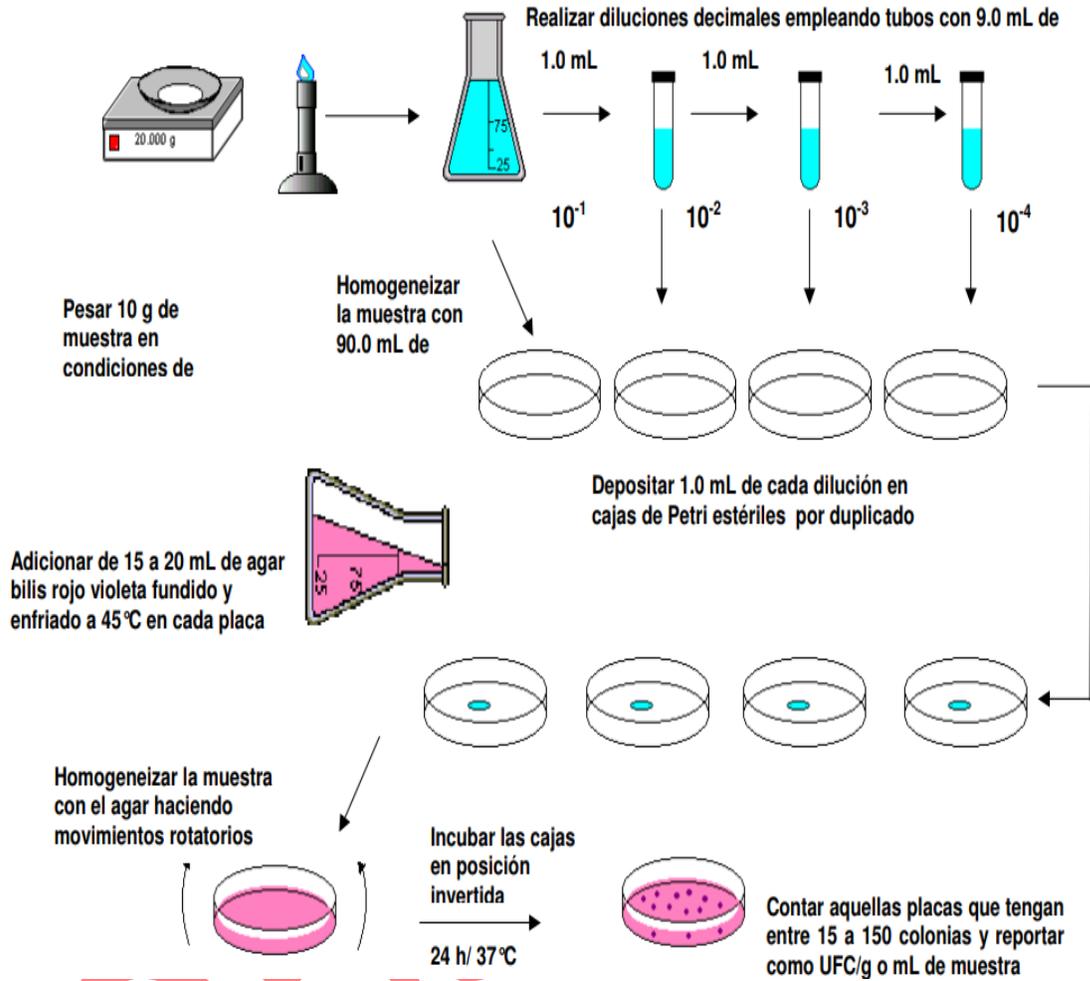
Identificación:  
**MAN-MIC-02**

Versión: **1**

Fecha creación:  
**11/Enero/2018**

Fecha actualización:  
**13/Mayo/2019**

### DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES POR CUENTA EN PLACA



	<b>MANUAL</b>	<b>Identificación:</b> MAN-MIC-02
	<b>MICROBIOLOGÍA SANITARIA</b>	<b>Versión:</b> 1
		<b>Fecha creación:</b> 11/Enero/2018
		<b>Fecha actualización:</b> 13/Mayo/2019

<b>DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES. TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE.</b>	
<b>Propósito del examen</b>	<p>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.</p>
<b>Principio y método del procedimiento utilizado para el examen</b>	<p>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.</p> <p>Y al utilizar altas temperaturas en el baño de agua y el medio confirmatorio se establece la presencia de coliformes fecales termoresistentes.</p>
<b>Características de desempeño</b>	No aplica
<b>Tipo de muestra</b>	<p>Alimentos. Se toman con las pinzas utilizadas para su distribución, y se colocan en bolsas o recipientes estériles para su transporte al laboratorio.</p> <p>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</p>

	<b>MANUAL</b>	<b>Identificación:</b> <b>MAN-MIC-02</b>
	<b>MICROBIOLOGÍA SANITARIA</b>	<b>Versión: 1</b>
		<b>Fecha creación:</b> <b>11/Enero/2018</b>
		<b>Fecha actualización:</b> <b>13/Mayo/2019</b>

	<p>agua para su recolección, en el caso de ser necesario utilizar tiosulfato de sodio para inhibir los agentes clorados.</p> <p>Hielo.</p> <p>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.</p>
<b>Preparación del paciente</b>	No aplica
<b>Tipo de contenedor y aditivos</b>	Ver MAN-TM-01
<b>Equipo y reactivos requeridos</b>	<p>Incubadora</p> <p>Mechero</p> <p>Balanza granataría</p> <p>Balanza analítica</p> <p>Autoclave</p> <p>Baño maría</p> <p>Matraz Erlenmeyer</p> <p>Parrilla eléctrica</p> <p>Propipetero</p> <p>Pipetas</p> <p>Vasos de vidrio</p> <p>Abatelenguas</p> <p>Campanas de durham</p> <p>Tubos de cultivo</p> <p>Reactivos</p> <p>Caldo lauril sulfato de sodio</p> <p>Caldo lactosa lauril verde brillante</p> <p>Caldo para <i>Escherichia coli</i> (EC)</p>

	<b>MANUAL</b>	<b>Identificación:</b> <b>MAN-MIC-02</b>
	<b>MICROBIOLOGÍA SANITARIA</b>	<b>Versión: 1</b>
		<b>Fecha creación:</b> <b>11/Enero/2018</b>
		<b>Fecha actualización:</b> <b>13/Mayo/2019</b>

<b>Controles ambientales y de seguridad</b>	<p>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.</p> <p>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.</p>
<b>Procedimientos de calibración</b>	<p>No aplica</p>
<b>Pasos del procedimiento</b>	<p>Para agua potable y hielo.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Agitar la muestra.</li> <li>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.</li> <li>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.</li> </ol> <p>Prueba para coliformes totales.</p> <p>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.</p> <p>Prueba confirmativa para coliformes fecales.</p>



# MANUAL

## MICROBIOLOGÍA SANITARIA

<b>Identificación:</b> MAN-MIC-02
<b>Versión:</b> 1
<b>Fecha creación:</b> 11/Enero/2018
<b>Fecha actualización:</b> 13/Mayo/2019

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 *Escherichia coli*), 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 mesofílicos 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 confirmes 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 *Escherichia coli*), 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.

	<b>MANUAL</b>	<b>Identificación:</b> MAN-MIC-02
	<b>MICROBIOLOGÍA SANITARIA</b>	<b>Versión:</b> 1
		<b>Fecha creación:</b> 11/Enero/2018
		<b>Fecha actualización:</b> 13/Mayo/2019

<b>Procedimientos de control de calidad</b>	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.
<b>Interferencias</b>	No aplica
<b>Principios del procedimiento para el cálculo de resultados</b>	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.
<b>Intervalos de referencia biológica o valores de decisión clínica</b>	<3 fecales.
<b>Intervalo reportable de los resultados del examen</b>	No aplica
<b>Instrucciones para determinar los resultados cuantitativos</b>	No aplica
<b>Valores de alerta o críticos</b>	No aplica
<b>Interpretación clínica del laboratorio</b>	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.

	<b>MANUAL</b>  <b>MICROBIOLOGÍA</b> <b>SANITARIA</b>	<b>Identificación:</b> MAN-MIC-02
		<b>Versión:</b> 1
		<b>Fecha creación:</b> 11/Enero/2018
		<b>Fecha actualización:</b> 13/Mayo/2019

<b>Fuentes potenciales de variación</b>	<p>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.</p> <p>Mantener la temperatura del baño de agua estable ya que de este dependerá la presencia de los coliformes termo-resistentes.</p>
<b>Referencias</b>	<p>NOM-112-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.</p> <p>NOM-251-SSA1-2009 “Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios”</p>

OBSOLETO



# MANUAL

## MICROBIOLOGÍA SANITARIA

**Identificación:**  
MAN-MIC-02

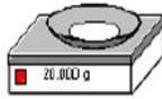
**Versión:** 1

**Fecha creación:**  
11/Enero/2018

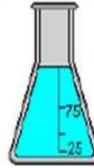
**Fecha actualización:**  
13/Mayo/2019

### 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



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

1.0 mL

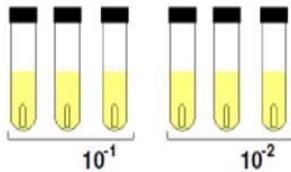
1.0 mL

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

$10^{-1}$

$10^{-2}$

$10^{-3}$

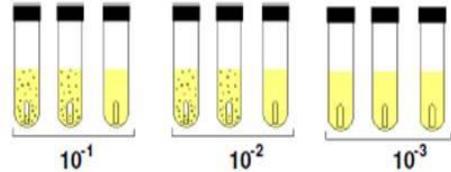


$10^{-1}$

$10^{-2}$

$10^{-3}$

35 °C  
24 - 48 h



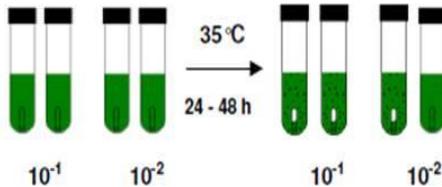
$10^{-1}$

$10^{-2}$

$10^{-3}$

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



$10^{-1}$

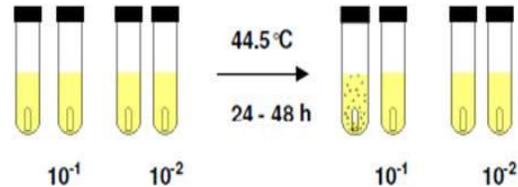
$10^{-2}$

$10^{-1}$

$10^{-2}$

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

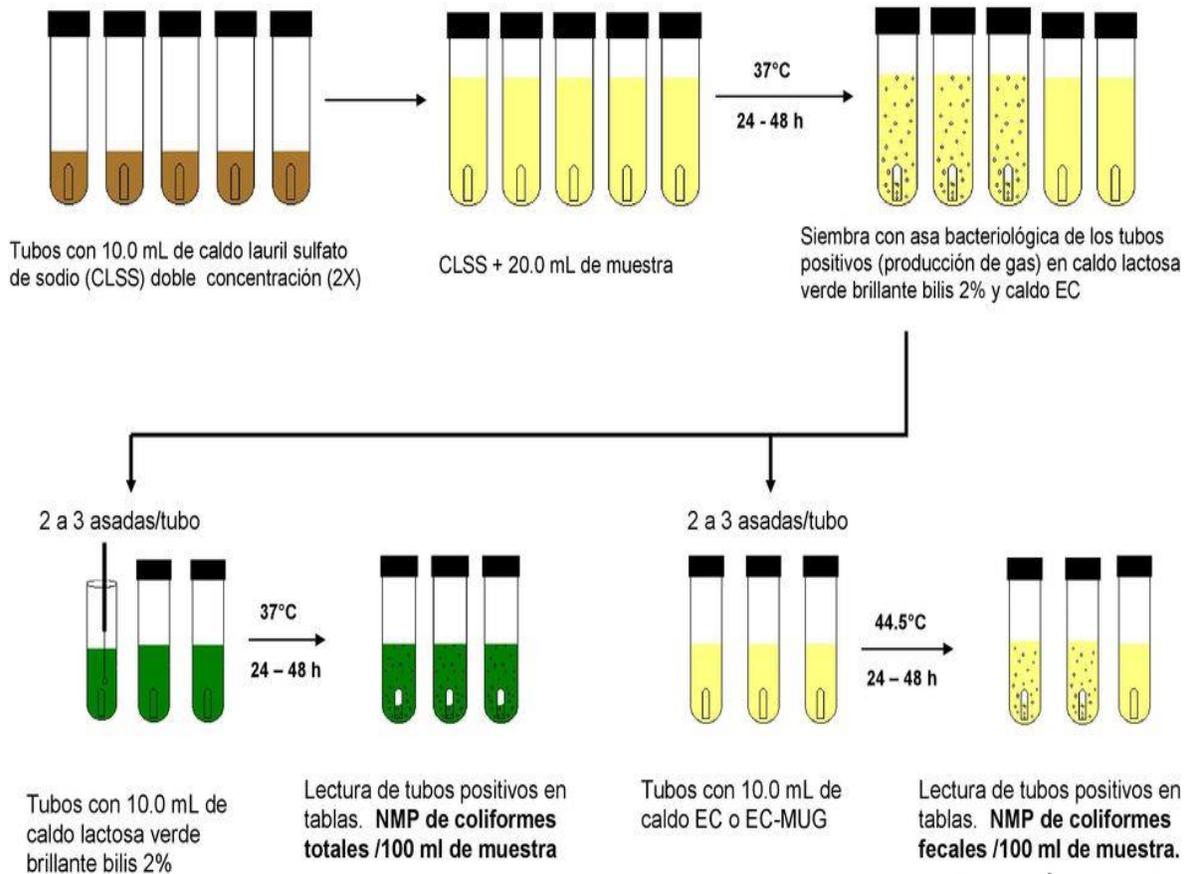
Identificación:  
**MAN-MIC-02**

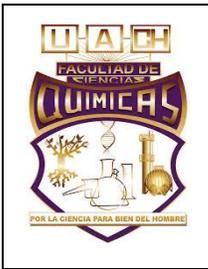
Versión: **1**

Fecha creación:  
**11/Enero/2018**

Fecha actualización:  
**13/Mayo/2019**

### DETERMINACIÓN DEL NMP DE COLIFORMES EN AGUA Y HIELO POTABLES





# MANUAL

## MICROBIOLOGÍA SANITARIA

Identificación:

MAN-MIC-02

Versión: 1

Fecha creación:

11/Enero/2018

Fecha actualización:

13/Mayo/2019

### 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.

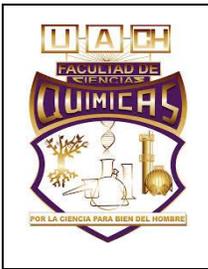
El método se basa en inocular una muestra conocida en un medio selectivo específico, acidificado a un pH de 3,5 e incubando a temperaturas de 25°C dando como resultado colonias características de estos microorganismos.

#### Principio y método del procedimiento utilizado para el examen

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.

	<b>MANUAL</b>	<b>Identificación:</b> MAN-MIC-02
	<b>MICROBIOLOGÍA SANITARIA</b>	<b>Versión:</b> 1
		<b>Fecha creación:</b> 11/Enero/2018
		<b>Fecha actualización:</b> 13/Mayo/2019

<b>Características de desempeño</b>	No aplica
<b>Tipo de muestra</b>	Alimentos Se tomaran con las pinzas utilizadas para su distribución, y se colocaran en bolsas o recipientes estériles para su transporte al laboratorio.
<b>Preparación del paciente</b>	No aplica
<b>Tipo de contenedor y aditivos</b>	Ver MAN-TM-01
<b>Equipo y reactivos requeridos</b>	<p>Incubadora</p> <p>Mechero</p> <p>Balanza granataría</p> <p>Balanza analítica</p> <p>Autoclave</p> <p>Baño maría</p> <p>Matraz Erlenmeyer</p> <p>Parrilla eléctrica</p> <p>Propipetero</p> <p>Pipetas</p> <p>Vasos de vidrio</p> <p>Abatelenguas</p> <p>Reactivos</p> <p>Agar papa dextrosa (PDA)</p> <p>Acido tartárico 10%</p>
<b>Controles ambientales y de seguridad</b>	El personal del área debe utilizar los implementos de bioseguridad como son: bata de laboratorio, guantes, lentes de seguridad y



# MANUAL

## MICROBIOLOGÍA SANITARIA

<b>Identificación:</b> MAN-MIC-02
<b>Versión:</b> 1
<b>Fecha creación:</b> 11/Enero/2018
<b>Fecha actualización:</b> 13/Mayo/2019

	<p>cubre bocas cuando sean manejadas las muestras microbiológicas.</p> <p>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.</p>
<b>Procedimientos de calibración</b>	No aplica
<b>Pasos del procedimiento</b>	<p>Preparación del medio de cultivo.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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.</li> <li>2) Una vez homogéneo se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.</li> <li>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%.</li> <li>4) Todo material que tendrá contacto con las muestras o los microorganismos deberán estar previamente estériles.</li> </ol> <p>Preparación y dilución de las muestras.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Muestras solidas o semisólidas, pesar 10.0 gramos de la muestra por analizar en un recipiente o bolsa plástica estéril de tamaño adecuado.</li> </ol>



# MANUAL

## MICROBIOLOGÍA SANITARIA

<b>Identificación:</b> MAN-MIC-02
<b>Versión:</b> 1
<b>Fecha creación:</b> 11/Enero/2018
<b>Fecha actualización:</b> 13/Mayo/2019

- 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, 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,

	<b>MANUAL</b>	<b>Identificación:</b> MAN-MIC-02
	<b>MICROBIOLOGÍA SANITARIA</b>	<b>Versión:</b> 1
		<b>Fecha creación:</b> 11/Enero/2018
		<b>Fecha actualización:</b> 13/Mayo/2019

	<p>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.</p> <p>9) Incubar las cajas a temperatura de <math>25 \pm 2^{\circ}\text{C}</math> durante 3, 4 ó 5 días h.</p> <p>Seleccionar aquellas cajas que tengan entre 10 a 150 UFC, para disminuir el error en la cuenta.</p>
<b>Procedimientos de control de calidad</b>	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.
<b>Interferencias</b>	No aplica
<b>Principios del procedimiento para el cálculo de resultados</b>	No aplica
<b>Intervalos de referencia biológica o valores de decisión clínica</b>	<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.
<b>Intervalo reportable de los resultados del examen</b>	No aplica
<b>Instrucciones para determinar los resultados cuantitativos</b>	Se determina mediante las diluciones realizadas a dicha muestra y Contar las colonias de cada placa después de 3, 4 y 5 días de incubación. Después de 5 días, seleccionar aquellas placas que contengan entre 10 y 150 colonias. Si alguna parte de la caja muestra crecimiento extendido de mohos o si es difícil contar

	<b>MANUAL</b>	<b>Identificación:</b> MAN-MIC-02
	<b>MICROBIOLOGÍA SANITARIA</b>	<b>Versión:</b> 1
		<b>Fecha creación:</b> 11/Enero/2018
		<b>Fecha actualización:</b> 13/Mayo/2019

	colonias bien aisladas, considerar los conteos de 4 días de incubación y aún de 3 días. En este caso, informar el periodo de incubación de 3 o 4 días en los resultados del análisis.
<b>Valores de alerta o críticos</b>	No aplica
<b>Interpretación clínica del laboratorio</b>	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.
<b>Fuentes potenciales de variación</b>	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.
<b>Referencias</b>	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

## MICROBIOLOGÍA SANITARIA

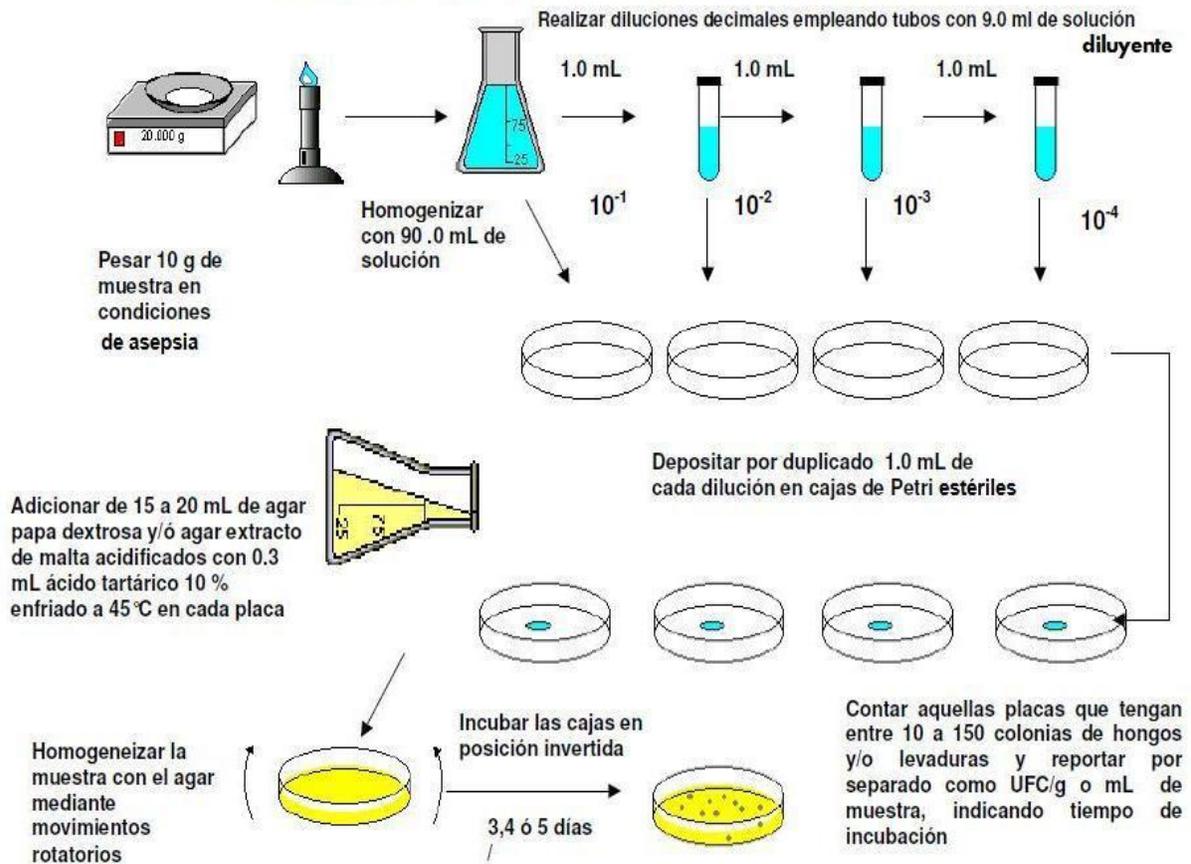
Identificación:  
**MAN-MIC-02**

Versión: **1**

Fecha creación:  
**11/Enero/2018**

Fecha actualización:  
**13/Mayo/2019**

### DETERMINACION DE MOHOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS



	<b>MANUAL</b>  <b>MICROBIOLOGÍA</b> <b>SANITARIA</b>	<b>Identificación:</b> MAN-MIC-02
		<b>Versión:</b> 1
		<b>Fecha creación:</b> 11/Enero/2018
		<b>Fecha actualización:</b> 13/Mayo/2019

## HISTORIAL DE REVISIONES

No. Revisión	No. Versión	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