

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER Gobernación de Santander</p>	<p align="center">MANUAL PARA RECUESTO DE MICROORGANISMOS MESOFILOS SEGUN STANDARD ORGANIZATION ISO 4833:2013</p> <p align="center">Laboratorio Departamental de Salud Pública</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-45
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	12/10/2022
		PÁGINA	1 de 11

TABLA DE CONTENIDO

1. OBJETIVO.....	2
2. ALCANCE	2
3. RESPONSABILIDADES	2
4. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS3CONDIC IONES GENERALES	3
6. FUNDAMENTO DEL METODO DE ENSAYO	4
7. LIMITACIONES O INTERFERENCIAS.....	4
8. RECOLECCION E IDENTIFICACION DE LA MUESTRA	5
9. CONSERVACION DE LA MUESTRA	4
10. EQUIPOS.....	5
11. REACTIVOS CONTROLES Y MATERIALES DE REFERENCIA	5
12. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO.....	5
13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO.....	6
14. ANALISIS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS	6
15. EMISION DEL INFORME DE RESULTADOS	8
16. EXÁMENES COMPLEMENTARIOS	8
17. DOCUMENTOS DE REFERENCIA.....	8
18. ANEXOS	8

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA RECuento DE MICROORGANISMOS MESOFILOS SEGUN STANDARD ORGANIZATION ISO 4833:2013 Laboratorio Departamental de Salud Pública	CÓDIGO	MI-GS-MA-45
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	12/10/2022
		PÁGINA	2 de 11

1. OBJETIVO

Describir la metodología llevada a cabo por el laboratorio de microbiología de alimentos para realizar el recuento de microorganismos capaces de crecer y formar colonias en un medio sólido tras la incubación a 30°C. Basados en la norma International ISO 4833-1:2013, Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Parte 1: Recuento de colonias a 30 ° C mediante la técnica de siembra en profundidad.

2. ALCANCE

Este documento se tomará de referencia en el laboratorio de microbiología de alimentos para realizar el recuento de microorganismos capaces de crecer y formar colonias en un medio sólido tras la incubación a 30°C. Basados en la norma International ISO 4833-1:2013, Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Parte 1: Recuento de colonias a 30 ° C mediante la técnica de siembra en profundidad.

Este recuento se considera como indicador del grado de contaminación de los alimentos en cualquier etapa del proceso de producción, permite también obtener información sobre la alteración incipiente de los alimentos y su probable vida útil; adicionalmente, suele proporcionar información con respecto a la existencia de prácticas incorrectas, tales como vertidos o manipulación inadecuada.

Esta parte de la Norma ISO 4833 resulta aplicable para:

- 1) productos que requieran un recuento fiable cuando se especifica un límite de detección bajo (inferior a 102/g o 102/ml en el caso de muestras líquidas o inferior a 103/g para muestras sólidas).
- 2) productos en los que se espera la presencia de colonias invasivas, que ocultan a las colonias de otros organismos. Por ejemplo, es probable que la leche o los productos lácteos contengan *Bacillus* spp. invasivas.

3. RESPONSABILIDADES

Coordinador LDSP: aprobar el presente documento, supervisar el estricto cumplimiento de lo establecido en el mismo y avalar los resultados que de éste se generen.

Profesional del Laboratorio Microbiológico de Alimentos, del Laboratorio

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA RECuento DE MICROORGANISMOS MESOFILOS SEGUN STANDARD ORGANIZATION ISO 4833:2013 Laboratorio Departamental de Salud Pública	CÓDIGO	MI-GS-MA-45
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	12/10/2022
		PÁGINA	3 de 11

Departamental de Salud Pública: aplicar las técnicas descritas en el presente manual, analizar las muestras, verificar que este procedimiento se lleve a cabo según está consignado.

Auxiliar del laboratorio de Alimentos del laboratorio Departamental de Salud Pública: es responsable de cumplir con lo definido para la ejecución de actividades relacionadas con lavado de material y limpieza de áreas, con el fin de que cumplan con los requerimientos necesarios para la ejecución del ensayo.

4. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

AEROBIO Estricto: Microorganismos que necesitan de Oxígeno para su crecimiento.

ANAEROBIO Estricto: Microorganismos que necesitan solo pueden crecer en ausencia de oxígeno.

ANAEROBIO FACULTATIVO: Microorganismos que necesitan solo pueden crecer en ausencia de oxígeno.

MESOFILOS: Este término es aplicado a los microorganismos cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 20 y 45 °C. moderada.

MICROORGANISMO: Es un ser vivo o un sistema biológico que solo puede visualizarse con el microscopio, que incluye bacteria, hongos, protozoos y virus.

5. CONDICIONES GENERALES

El parámetro aerobio mesófilos, más que englobar un grupo taxonómico de bacterias, se designa a los microorganismos, capaces de desarrollar en presencia de oxígeno a una temperatura comprendida entre 20°C y 45°C con una óptima entre 30°C y 37°C en un medio de cultivo nutritivo durante 24 a 48 horas de incubación.

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos, en condiciones establecidas, estima la microflora total sin especificar tipos de microorganismos. Refleja la calidad sanitaria de los productos analizados, indicando además de las condiciones higiénicas de la materia prima, la forma como fueron manipulados durante su elaboración.

Un recuento bajo de aerobios mesófilos no implica o no asegura la ausencia de

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA RECUESTO DE MICROORGANISMOS MESOFILOS SEGUN STANDARD ORGANIZATION ISO 4833:2013 Laboratorio Departamental de Salud Pública	CÓDIGO	MI-GS-MA-45
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	12/10/2022
		PÁGINA	4 de 11

patógenos o sus toxinas, de la misma manera un recuento elevado no significa presencia de flora patógena. Ahora bien, salvo en alimentos obtenidos por fermentación, no son recomendables recuentos elevados.

Un recuento elevado puede significar:

- Materia prima excesivamente contaminada.
- Deficientes métodos de manipulación durante la elaboración de los productos o platos preparados.
- Posibilidad de que entre ellos pueda haber patógenos, dado que también suelen ser mesófilos.
- Altos recuentos suelen ser signo de inmediata alteración del producto. Tasas superiores o iguales a 1.000.000 – 10.000.000 de bacterias por gramo de producto alimentario suelen ser ya inicio de descomposición.

6. FUNDAMENTO DEL METODO DE ENSAYO

Una cantidad determinada de líquido para análisis o empleando una cantidad determinada de una suspensión inicial en el caso de otros productos. Se siembran en profundidad dos cajas, empleando un medio de cultivo determinado y se preparan otros pares de cajas en profundidad, bajo las mismas condiciones, empleando diluciones decimales de la muestra para análisis o de la suspensión inicial.

Las cajas se incuban en condiciones aeróbicas a 30 °C durante 72 h

El número de microorganismos por mililitro o por gramo de muestra se calcula a partir del número de colonias obtenidas en cajas seleccionadas por debajo de las 300 colonias

7. LIMITACIONES O INTERFERENCIAS

En el uso o la interpretación del recuento de microorganismo aerobios mesófilos hay ciertos factores que deben ser tenidos en cuenta: Este recuento es sólo de microorganismos vivos.

La utilidad del indicador depende de la historia del producto y el momento de la toma de muestra. En alimentos perecederos manipulados correctamente pueden desarrollar recuentos elevados y perder calidad si son almacenados por un período de tiempo prolongado. En este caso, el recuento no se encontraría elevado por la

	MANUAL PARA RECUESTO DE MICROORGANISMOS MESOFILOS SEGUN STANDARD ORGANIZATION ISO 4833:2013 Laboratorio Departamental de Salud Pública	CÓDIGO	MI-GS-MA-45
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	12/10/2022
		PÁGINA	5 de 11

condición de higiene del producto, sino por la vida útil del mismo. Los procedimientos que sufre el alimento en su elaboración, por ejemplo, un proceso térmico, pueden enmascarar productos con altos recuentos o condiciones deficientes de higiene. Además, el almacenamiento prolongado en congelación o con pH bajo puede producir una disminución del recuento.

El recuento de mesófilos nos indica las condiciones higiénico-sanitarias de algunos alimentos, pero no tiene significado sanitario en productos que han sido madurados con bacterias (por ejemplo, quesos) o alimentos que dentro de su formulación tienen conservadores.

8. RECOLECCION E IDENTIFICACION DE LA MUESTRA

Ver manual de toma y recepción de muestras de alimentos y bebidas alcohólicas laboratorio de salud pública de Santander MI-GS-MA-08, inciso 3: Toma de muestras de alimentos, Tabla 2: Método de recolección de muestras de alimentos y materias primas sólidas, líquidas, deshidratadas y congeladas e inciso 6.2 Entrega de muestras al laboratorio.

9. CONSEVACION DE LA MUESTRA

La muestra se conserva de acuerdo con la naturaleza del producto manteniendo las temperaturas de almacenamiento correspondientes.

10. EQUIPOS

- ✓ Cabina de Flujo laminar
- ✓ Homogenizador de muestras
- ✓ Estufa de esterilización
- ✓ Autoclave
- ✓ Equipo para mezclado
- ✓ Balanza analítica
- ✓ Incubadora a 30 ° C +/- 2 ° C
- ✓ Contador de colonias
- ✓ Cajas de Petri estériles
- ✓ Pipetas de 1 mL estériles
- ✓ Puntas estériles
- ✓ Vórtex

 <p>República de Colombia</p> <p>GOBIERNO DE SANTANDER</p> <p>Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA RECUESTO DE MICROORGANISMOS MESOFILOS SEGUN STANDARD ORGANIZATION ISO 4833:2013	CÓDIGO	MI-GS-MA-45
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	12/10/2022
		PÁGINA	6 de 11
Laboratorio Departamental de Salud Pública			

11. REACTIVOS, CONTROLES Y MATERIALES DE REFERENCIA

- ✓ Agua peptona bufferada 0.1% (BPW)
- ✓ Agar Plate Count (PCA)
- ✓ Cepa *E.coli* ATCC 25922

12. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

- 1) Desinfectar con alcohol al 70% el sitio por donde se vaya a extraer la muestra.
- 2) Abrir aséptica y adecuadamente la muestra
- 3) Preparar la muestra: macerar, picar, mezclar y pesar 10 g representativos de la muestra total, en el frasco previamente marcado de dilución que contiene 90 ml de agua peptonada 0.1%, en una balanza previamente tarada, para obtener una dilución 10^{-1}
- 4) Mezclar muy bien la muestra para asegurar su homogenización antes de preparar las diluciones.
- 5) Preparar diluciones consecutivas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-n} , etc.) según el criterio.
- 6) Preparar la dilución 10^{-2} , tomando 1ml de muestra de la dilución 10^{-1} (es la dilución que contiene 90 ml de agua peptonada 0.1% y 10 g de la muestra) y transferirlos a un tubo que contenga 9 ml de agua peptonada 0.1%, agitar cuidadosamente.
- 7) Preparar la dilución 10^{-3} , tomando 1ml de muestra de la dilución 10^{-2} (es la dilución que contiene 90 ml de agua peptonada 0.1% y 10 g de la muestra) y transferirlos a un tubo que contenga 9 ml de agua peptonada 0.1%, agitar cuidadosamente.
- 8) **NOTA:** Repetir desde el paso 7 tomando la dilución inmediatamente anterior hasta obtener la dilución necesaria; cada dilución sucesiva disminuirá 10 veces la concentración
- 9) Tomar 4 cajas de Petri estériles y transferir a 2 cajas 1 ml de la dilución 10^{-1} y a las otras 2 cajas 1 ml de la dilución 10^{-2} .
 - a. **NOTA:** Si es necesario, se repite el procedimiento con más diluciones, empleando una nueva punta para cada dilución decimal.
- 10) Agregar a cada una de las cajas 10 a 15 ml de agar Plate Count (PCA) que debe estar a una temperatura de 44 – 47 °C y mezclar cuidadosamente el inóculo con el medio mediante rotación de las cajas de Petri de la siguiente manera:
 - a. Mover la caja de arriba hacia abajo 5 veces
 - b. Mover caja cinco veces en el sentido de las agujas del reloj
 - c. Rotar la caja cinco veces en el sentido contrario de las agujas del reloj.

	MANUAL PARA RECUESTO DE MICROORGANISMOS MESOFILOS SEGUN STANDARD ORGANIZATION ISO 4833:2013 Laboratorio Departamental de Salud Pública	CÓDIGO	MI-GS-MA-45
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	12/10/2022
		PÁGINA	7 de 11

- 11) Una vez solidificadas las cajas y si se sospecha que el producto que se esté examinando contiene microorganismos cuyas colonias sobrecrecerán en la superficie del medio, verter 4 ml de agar en la superficie del medio inoculado.
- 12) Incubar las cajas de Petri a 30 °C ± 1 °C durante 72 h ± 3 h.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

Los ensayos se realizarán de acuerdo con el procedimiento de aseguramiento de la calidad de técnicas y medios de Cultivo, Preparación, esterilización y control de calidad de medios de cultivo MI-GS-GI-79, y registrar los datos de preparación en el formato control de medios de cultivo preparados MI-GS-RG-113.

14. ANALISIS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Seleccionar las placas que presenten entre 1 y 300 colonias. Contar las colonias utilizando el equipo contador de colonias. Examinar las placas bajo una luz tenue.

Es importante que las colonias diminutas sean incluidas en el recuento sin confundirlas con partículas insolubles o precipitadas del alimento. Se examinan los objetos dudosos detenidamente, utilizando lentes de aumento si es necesario, para poder distinguir las colonias de otros materiales. Las “colonias diseminadas” o dispuestas en rosario se consideran como una colonia.

Si menos un cuarto (1/4) de la placa está cubierto por un crecimiento difuso o diseminado, se cuentan las colonias en la parte de la placa no afectada y se calcula el número correspondiente para la placa de Petri entera, deduciéndolo por extrapolación del número teórico que debería corresponder a la placa entera. Si hay sobre crecimiento en un área superior a un cuarto de la placa, se rechaza este recuento.

Se informará el resultado del Análisis en el formato de datos primarios MI-GS-RG-157 Realizar los cálculos teniendo en cuenta las colonias que se contaron en cada caja de las diluciones realizadas, utilizando la siguiente expresión:

$$N = \frac{\sum C}{V (n1 + (0.1 \times n2)) d}$$

Donde:

	MANUAL PARA RECuento DE MICROORGANISMOS MESOFILOS SEGUN STANDARD ORGANIZATION ISO 4833:2013 Laboratorio Departamental de Salud Pública	CÓDIGO	MI-GS-MA-45
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	12/10/2022
		PÁGINA	8 de 11

ΣC = Sumatoria de las colonias contadas en todas las cajas de Petri que contiene las diluciones sucesivas

V = Volumen del inóculo aplicado a cada caja (ml)

n 1 = # de Cajas retenida en la primera dilución

n 2 = # de cajas retenida en la segunda dilución

d = Factor de dilución de la primera dilución retenida

Ejemplo:

Dilución	Recuento 1	Recuento 2
10 ⁻¹	130	128
10 ⁻²	14	13
10 ⁻³	1	0
10 ⁻⁴	0	0

$$N = \frac{130 + 128 + 14 + 13}{1 (2 + (0.1 \times 2))} \times \frac{285}{0.22} = 1295.5 \text{ ufc/g o ml}$$

Si solo se observa crecimiento en una dilución se utiliza la siguiente fórmula:

$$N = \frac{X + Y}{2} \times \text{Factor de dilución}$$

Ejemplo:

Dilución	Recuento 1	Recuento 2
10 ⁻¹	10	12
10 ⁻²	0	0
10 ⁻³	0	0
10 ⁻⁴	0	0

$$N = \frac{10 + 12}{2} \times 10$$

$$N = 110 \text{ ufc/g o ml}$$

Informar el resultado en unidades formadoras de colonia ufc/ g o ml de acuerdo al

	MANUAL PARA RECuento DE MICROORGANISMOS MESOFILOS SEGUN STANDARD ORGANIZATION ISO 4833:2013 Laboratorio Departamental de Salud Pública	CÓDIGO	MI-GS-MA-45
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	12/10/2022
		PÁGINA	9 de 11

producto analizado. Si no se observan colonias después de 72 horas de incubación se reporta como menor de 10 ufc/g o ml.

15. EMISION DEL INFORME DE RESULTADOS

Los resultados se emiten en la plantilla que contiene información general del punto de toma, información de la muestra recibida y los análisis realizados.

Ver guía para el reporte de los resultados emitidos por el laboratorio de salud pública de Santander MI-GS-GI-31 en el inciso 5.3 Informe de resultados área atención al ambiente alimentos.

16. EXÁMENES COMPLEMENTARIOS

Este ensayo no requiere de exámenes complementarios

17. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

Merck Manual de Medios de Cultivo E. Merck Darmstadt (RF. DE Alemania), 1985.

International Organization for Standardization ISO 4833-1. Microbiology of the food chain Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Part 1: Colony count at 30°C by the pour plate technique. 2013

Norma Técnica Colombiana NTC 4519 MICROBIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS PARA CONSUMO HUMANO Y ANIMAL. MÉTODO HORIZONTAL PARA EL RECuento DE MICROORGANISMOS. TÉCNICA DE RECuento DE COLONIAS A 30°C

International Organization for Standardization ISO 7218: 2007. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico

18. ANEXOS



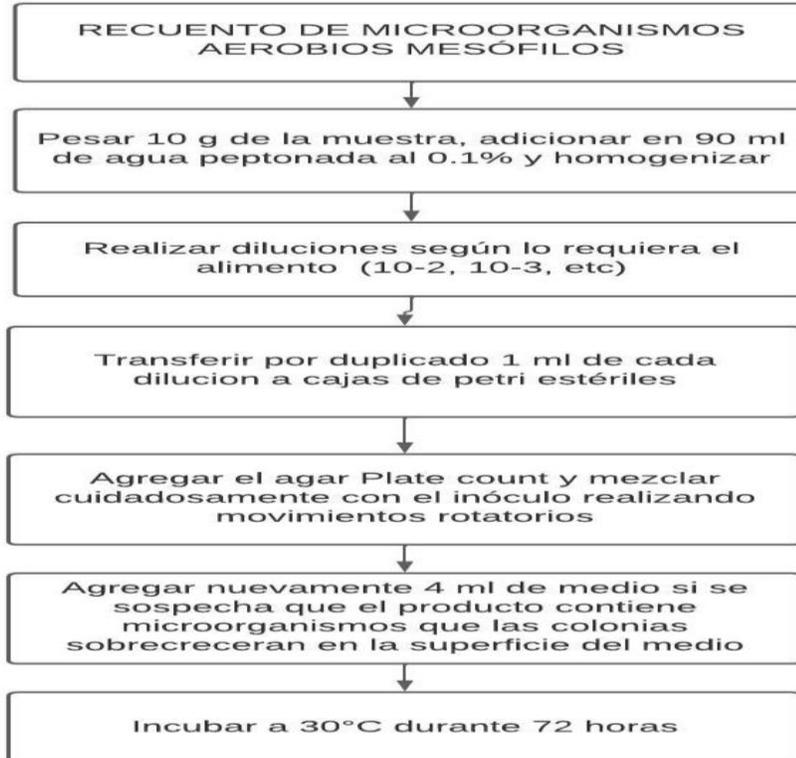
Crecimiento de mesófilos en

	MANUAL PARA RECUENTO DE MICROORGANISMOS MESOFILOS SEGUN STANDARD ORGANIZATION ISO 4833:2013 Laboratorio Departamental de Salud Pública	CÓDIGO	MI-GS-MA-45
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	12/10/2022
		PÁGINA	10 de 11

PREPARACION DEL AGAR PLATE COUNT

AGAR	FORMULA	g/Litro	PREPARACIÓN
AGAR PLATE COUNT (AGAR PEPTONA DE CASEINA GLUCOSA EXTRACTO DE LEVADURA)	Peptona de caseína Extracto de levadura D (+) Glucosa Agar-agar	5.0 2.5 1.0 14.0	Disolver 22.5 g en un litro de agua destilada, esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C

18.1 FLUJOGRAMA



 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA RECUESTO DE MICROORGANISMOS MESOFILOS SEGUN STANDARD ORGANIZATION ISO 4833:2013 Laboratorio Departamental de Salud Pública	CÓDIGO	MI-GS-MA-45
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	12/10/2022
		PÁGINA	11 de 11

19. CONTROL DE CAMBIOS

CONTROL DE CAMBIOS					
VERSIÓN	FECHA	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO	ELABORO	REVISO	APROBO
0	04/08/2022	Emisión inicial del documento	SANDRA BOHORQUEZ Profesional Universitario Microbiología de alimentos AYDEE LOPEZ SANCHEZ Profesional Universitario Microbiología de alimentos VIANEY PORTILLA R Profesional universitario Responsable Técnico Microbiología Aguas y Alimentos.	ALBA ROCIO ORDUZ A Líder Grupo LSP GERMAN MARIN C Director de Salud Integral DIEGO SANCHEZ BAEZ Coordinador Grupo de Apoyo a la Gestión y Calidad. CESAR ERNESTO SAENZ ARANDA Director de Planeación y Mejoramiento en Salud.	JAVIER ALONSO VILLAMIZAR SUAREZ Secretario de Salud de Santander