

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA EL RECUESTO DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASA POSITIVA EN MUESTRAS DE ALIMENTOS SEGÚN NORMA INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION ISO 6888-1: 2021 Laboratorio Departamental de Salud Pública	CÓDIGO	MI-GS-MA-46
		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 ABREVIATURAS	2
5. CONDICIONES GENERALES	2
6. FUNDAMENTO DEL MÉTODO DE ENSAYO	3
7. LIMITACIONES O INTERFERENCIAS	3
8. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA	3
9. CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA	3
10. EQUIPOS	3
11. REACTIVOS, CONTROLES Y MATERIALES DE REFERENCIA	4
12. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO	4
13. CONTROL DE CALIDAD	5
14. ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS	6
15. EMISIÓN DEL INFORME DE RESULTADOS	7
16. EXAMENES COMPLEMENTARIOS	7
17. DOCUMENTOS DE REFERENCIA	7
18. ANEXOS	<u>7</u>

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA EL RECUENTO DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASA POSITIVA EN MUESTRAS DE ALIMENTOS SEGÚN NORMA INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION ISO 6888-1: 2021 Laboratorio Departamental de Salud Pública	CÓDIGO	MI-GS-MA-46
		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 *Staphylococcus coagulasa* positiva. Basados en la norma International ISO 6888-1:2021, Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para el recuento de *Staphylococcus coagulasa* positiva (*Staphylococcus aureus* y otras especies). Parte 1: Método utilizando agar Baird Parker.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica para realizar el recuento y la confirmación de *Staphylococcus coagulasa* positiva (*Staphylococcus aureus* y otras especies) por técnica de recuento de colonias en placa en muestras de alimentos después de la incubación aeróbica de 34 °C a 38 °C y confirmación de coagulasa.

3. RESPONSABILIDADES

Será responsabilidad del profesional asignado, según cronograma de análisis de muestras, Verificar que este procedimiento se lleve a cabo según está consignado en este documento.

4. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

STAPHYLOCOCCUS: células esféricas Gram positivas por lo general dispuestas en racimos irregulares parecidos a las uvas. Se desarrollan rápidamente en muchos tipos de medios y tienen actividad metabólica, fermentan carbohidratos y producen pigmentos que varían desde un color blanco hasta un amarillo intenso.

STAPHYLOCOCCUS COAGULASA POSITIVO: Bacteria que forma colonia característica y no característica en la superficie del medio agar Baird Parker, y que presenta una reacción de coagulasa positiva cuando la determinación es llevada a cabo por la presente técnica.

5. CONDICIONES GENERALES

Staphylococcus aureus se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo, estimándose que una de cada tres personas se halla colonizada, aunque no infectada. Puede producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas relativamente benignas, tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsias, endocarditis o neumonía. Además, puede afectar al aparato gastrointestinal por la ingestión de alimentos contaminados con la enterotoxina estafilocócica secretada por la bacteria.

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA EL RECUENTO DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASA POSITIVA EN MUESTRAS DE ALIMENTOS SEGÚN NORMA INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION ISO 6888-1: 2021 Laboratorio Departamental de Salud Pública	CÓDIGO	MI-GS-MA-46
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	12/10/2022
		PÁGINA	3 de 11

La presencia de *Staphylococcus aureus* en un alimento se interpreta como indicativo de contaminación a partir de piel, boca y fosas nasales de los manipuladores de alimentos, material, equipos sucios y materias primas de origen animal contaminados.

La intoxicación estafilocócica se puede evitar impidiendo el crecimiento de *S. aureus* enterotoxigénicos en los alimentos. Para ello es necesario respetar las buenas prácticas de higiene a lo largo de la cadena alimentaria, especialmente en el momento de preparación de las comidas.

6. FUNDAMENTO DEL MÉTODO DE ENSAYO

El método consiste en inoculación en la superficie del medio de cultivo sólido selectivo por duplicado, con una cantidad específica de la muestra si el producto es líquido o con una cantidad específica de la dilución inicial en caso de otros productos. Inoculación bajo las mismas condiciones de la dilución inicial o de las diluciones decimales utilizando dos placas por cada dilución.

Incubación aeróbica a 34°C a 38°C y observación de las placas a las 24 h y 48 h. Cálculo del número de *Staphylococcus coagulasa* positiva por mililitro o por gramo de muestra a partir del número de colonias típicas y/o atípicas obtenidas en una determinada dilución y confirmadas por la prueba de la coagulasa.

7. LIMITACIONES O INTERFERENCIAS

Algunas bacterias pertenecientes a otros géneros pueden dar colonias de apariencia similar a las de *Staphylococcus*, pero realizando una observación microscópica con coloración de Gram antes de la confirmación se puede realizar una separación de géneros.

8. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN 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. CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

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

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA EL RECUENTO DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASA POSITIVA EN MUESTRAS DE ALIMENTOS SEGÚN NORMA INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION ISO 6888-1: 2021 Laboratorio Departamental de Salud Pública	CÓDIGO	MI-GS-MA-46
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	12/10/2022
		PÁGINA	4 de 11

10. EQUIPOS

- ✓ Cabina de Flujo laminar
- ✓ Homogeneizador de muestras
- ✓ Autoclave
- ✓ Balanza analítica
- ✓ Incubadora a 35° C +/-2°C
- ✓ Cajas de Petri estériles
- ✓ Micropipeta 100-1000 uL
- ✓ Varilla de hockey en forma de L
- ✓ Gradillas
- ✓ Tubos tapa rosca

11. REACTIVOS, CONTROLES Y MATERIALES DE REFERENCIA

- ✓ Agar base selectivo para Staphylococcus según Baird Parker
- ✓ Telurito de potasio al 3.5 %
- ✓ Emulsión de yema de huevo al 20 % (20 ml de yema de huevo y 80 ml de solución salina al 0.85% colocar 5 ml de esta emulsión por cada 100 ml de agar base preparado)
- ✓ Caldo infusión cerebro corazón B.H.I.
- ✓ Plasma deshidratado de conejo E.D.T.A. 0,1%
- ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 o ATCC 25923
- ✓ *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. Rotular los frascos schott con su respectivo número de muestra
3. Mezclar muy bien la muestra para asegurar su homogenización antes de preparar las diluciones.
4. Abrir aséptica y adecuadamente la muestra.
5. 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
6. Realizar diluciones según el patrón definido para cada alimento.
7. Preparar diluciones consecutivas (10⁻², 10⁻³). 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

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA EL RECUENTO DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASA POSITIVA EN MUESTRAS DE ALIMENTOS SEGÚN NORMA INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION ISO 6888-1: 2021 Laboratorio Departamental de Salud Pública	CÓDIGO	MI-GS-MA-46
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	12/10/2022
		PÁGINA	5 de 11

- peptonada 0.1%, agitar cuidadosamente
8. Atemperar las placas de Agar Baird Parker, dejar solidificar y secar la superficie de las placas según el anexo 2
 9. Transferir 0.1 mL de cada una de las diluciones sobre la superficie del Agar Baird Parker
 10. Extender el inóculo sobre la superficie del Agar, con la ayuda de la varilla de hockey, hasta que la superficie quede seca
 11. Invertir las placas e incubarlas a 35 ° C + / - 2 ° C durante 48 horas
 12. Seleccionar las placas que presenten entre 20 y hasta 150 colonias aisladas y contar las colonias negras y brillantes, con bordes reducidos blancos, rodeadas de zonas claras que contrastan con el medio opaco, zona de precipitado, y colonias atípicas negras sin halo.
 13. Tomar cinco colonias típicas y atípicas, realizar la prueba de la coagulasa.

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. ANÁLISIS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Calcular para cada una de las placas seleccionadas el número a de Staphylococcus coagulasa positiva identificados mediante la prueba de coagulasa de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$a = \frac{b_c}{A_c} \times C_c + \frac{b_{nc}}{A_{nc}} \times C_{nc}$$

Donde:

A_c : es el número de colonias típicas sometidas a la prueba de la coagulasa

A_{nc} : es el número de colonias atípicas sometidas a la prueba de la coagulasa

b_c : es el número de colonias típicas que dieron positiva la prueba de la coagulasa

b_{nc} : es el número de colonias atípicas que dieron positiva la prueba de la coagulasa

C_c : es el número de total de colonias típicas que se contaron en la placa

C_{nc} : es el número de total de colonias atípicas que se contaron en la placa

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA EL RECUENTO DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASA POSITIVA EN MUESTRAS DE ALIMENTOS SEGÚN NORMA INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION ISO 6888-1: 2021 Laboratorio Departamental de Salud Pública	CÓDIGO	MI-GS-MA-46
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	12/10/2022
		PÁGINA	6 de 11

Para las cajas que contienen un máximo de 300 colonias con 150 colonias típicas y/o atípicas en dos diluciones consecutivas calcular el número de Staphylococcus coagulasa positiva para cada caja como se especifica anteriormente y calcular como un promedio de las dos diluciones sucesivas, el número N de Staphylococcus coagulasa positiva identificados, presentes en la porción de muestra sembrada, utilizando la siguiente ecuación:

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0.1n_2)d}$$

Donde:

Σa : es el número de colonias de Staphylococcus coagulasa positiva identificadas en todas las placas seleccionadas

V: es el volumen de inóculo en cada placa en mililitros

n_1 : es el número de placas seleccionadas de la primera dilución

n_2 : es el número de placas seleccionadas de la segunda dilución

d: es el factor de dilución correspondiente a la primera dilución seleccionada (la suspensión inicial es una dilución)

Para las cajas que contienen menos de 15 colonias identificadas, el resultado se informa de la siguiente manera:

Estimación por mL

$$N_e = \frac{\sum a}{V \times 2}$$

Estimación por gramo

$$N_e = \frac{\sum a}{V \times 2 \times d}$$

Donde:

Σa : es la sumatoria de las colonias de Staphylococcus coagulasa positiva identificadas

V: es el volumen sembrado en cada placa

d: es el factor de dilución de la suspensión

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

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA EL RECUENTO DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASA POSITIVA EN MUESTRAS DE ALIMENTOS SEGÚN NORMA INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION ISO 6888-1: 2021 Laboratorio Departamental de Salud Pública	CÓDIGO	MI-GS-MA-46
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	12/10/2022
		PÁGINA	7 de 11

analizado. Si no se observan colonias después de 48 horas de incubación se reporta como menor de 100 ufc/g o ml

15. EMISIÓN 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

Prueba de la coagulasa

- ✓ Transferir el número de colonias a confirmar a un número igual de tubos que contienen 5 mL de caldo infusión cerebro corazón (BHI)
- ✓ Hacer un control positivo sembrando una cepa de *Staphylococcus aureus* en un tubo que contiene 5 ml de caldo BHI
- ✓ Incubar a 35 ° C +/- 2°C durante 18 - 24 horas
- ✓ Pasado este tiempo, transferir 0.1 mL de cada uno de los cultivos de Caldo infusión cerebro corazón (BHI) a tubos que contienen 0.3 mL de plasma deshidratado de conejo E.D.T. A.
- ✓ Transferir a un tubo 0.1 mL caldo BHI a 0.3 mL de plasma deshidratado de conejo como control negativo.
- ✓ Incubar a 35 ° C +/- 2° C de 4 a 6 horas
- ✓ Examinar la coagulación del plasma mediante la inclinación del tubo después del tiempo de incubación, comparándolos con los controles positivo y negativo.
- ✓ En caso negativo descartar hasta las 24 horas.

17. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

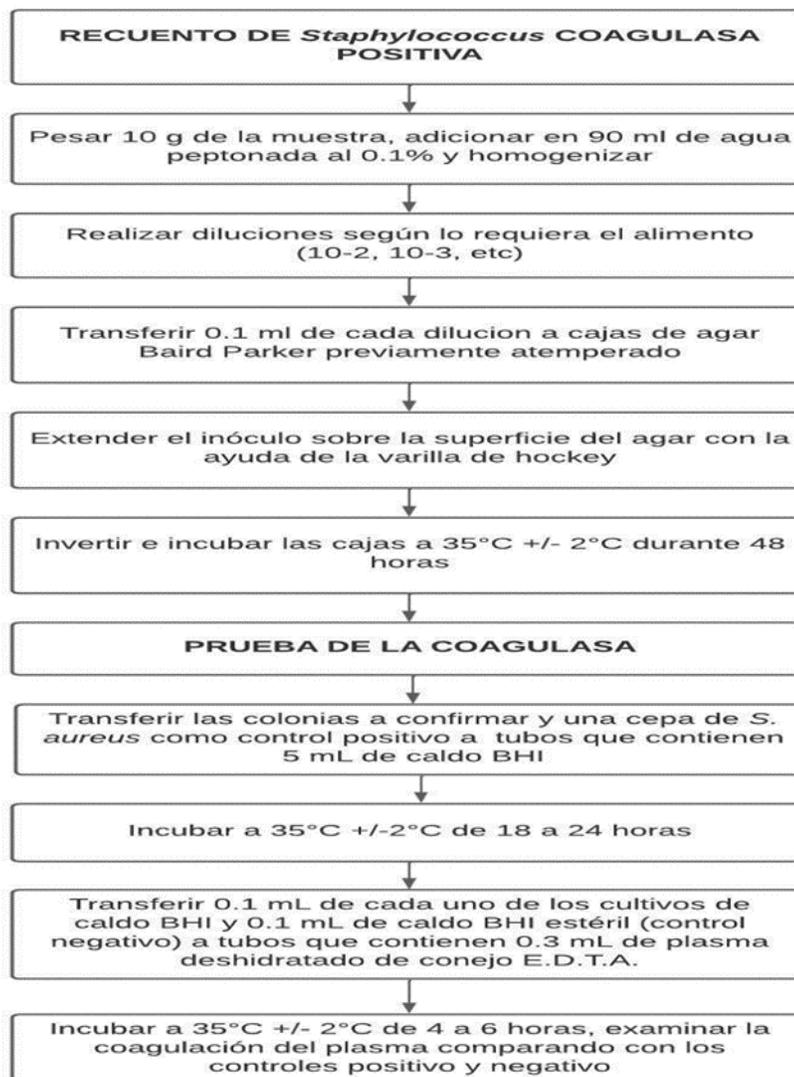
- Procedimiento según International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Recuento de Staphylococcus coagulasa Positiva en muestras de alimentos Técnica de recuento en placa.

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA EL RECuento DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASA POSITIVA EN MUESTRAS DE ALIMENTOS SEGÚN NORMA INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION ISO 6888-1: 2021 Laboratorio Departamental de Salud Pública	CÓDIGO	MI-GS-MA-46
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	12/10/2022
		PÁGINA	8 de 11

- ✓ International Organization for Standardization. ISO 6888-1 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). Part 1. Method using Baird-Parker agar medium. 2021

18. ANEXOS

18.1 ANEXO 1 FLUJOGRAMA



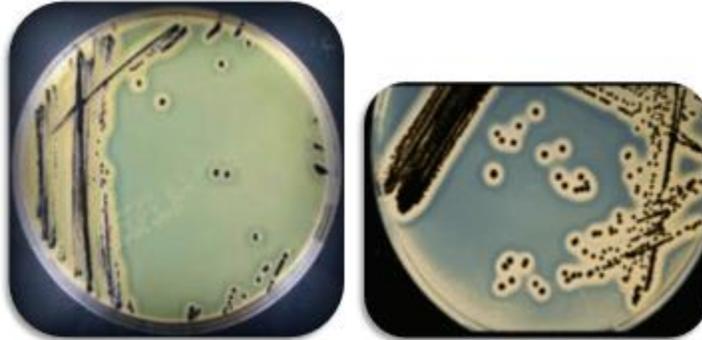
	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA EL RECUESTO DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASA POSITIVA EN MUESTRAS DE ALIMENTOS SEGÚN NORMA INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION ISO 6888-1: 2021 Laboratorio Departamental de Salud Pública	CÓDIGO	MI-GS-MA-46
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	12/10/2022
		PÁGINA	9 de 11

18.2 ANEXO 2

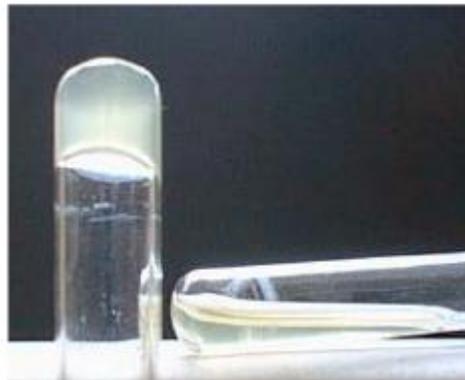
REACTIVOS	FORMULA	g/litro	PREPARACION
AGAR BASE SELECTIVO PARA ESTAFILOCOCO Según BAIRD PARKER	<ol style="list-style-type: none"> 1. Peptona de caseína 2. Extracto de levadura 3. Extracto de carne 4. Piruvato de Sodio 5. Agar-agar 6. Glicina 7. Cloruro de litio 	10.0 1.0 5.0 10.0 15.0 12.0 5.0	Disolver 58 g en un litro de agua destilada y esterilizar en autoclave, enfriar a 45-50°C. Añadir mezclando 50 ml de emulsión de yema de huevo al 20 % y 3 ml de solución al 3.5 % de telurito de potasio, verter en placas
CALDO INFUSION CEREBRO CORAZON (BHI)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Infusión cerebro 2. Infusión corazón 3. Proteasa-peptona 4. D(+) Glucosa 5. Di-sodio Hidrogenofosfato 	12.5 5.0 10.0 2.0 2.5	Disolver 37 g en un litro de agua destilada, ajustar el pH a 7.4 +/- 0.2. Distribuir 5 ml en tubos de ensayo y esterilizar en autoclave.
SOLUCION SALINA ESTERIL 0.85 %	<ol style="list-style-type: none"> 1. Cloruro de sodio 2. Agua Destilada 	0.85 C.S. P 100	Pesar 0.85 g y completar a 100ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121 °.
TELURITO DE POTASIO AL 3.5%	<ol style="list-style-type: none"> 1. Telurito de Potasio 2. Agua Destilada 	35 C.S. P 100	pesar 3.5 g y completar a 100 ml con agua destilada
EMULSION DE YEMA DE HUEVO 20 %	Se lavan los huevos de gallina frescos, se dejan en alcohol al 70%, se flamean y se abren asépticamente bajo condiciones estériles, separar las yemas de las claras. Se mezclan homogéneamente 20 ml de yema de huevo con 80 ml de solución fisiológica estéril.		

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA EL RECUESTO DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASA POSITIVA EN MUESTRAS DE ALIMENTOS SEGÚN NORMA INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION ISO 6888-1: 2021 Laboratorio Departamental de Salud Pública	CÓDIGO	MI-GS-MA-46
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	12/10/2022
		PÁGINA	10 de 11

18.3 ANEXO 3



Colonias en agar Baird Parker



Prueba de coagulasa positiva (izquierda) y negativa (derecha)

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA EL RECUENTO DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASA POSITIVA EN MUESTRAS DE ALIMENTOS SEGÚN NORMA INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION ISO 6888-1: 2021 Laboratorio Departamental de Salud Pública	CÓDIGO	MI-GS-MA-46
		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	29/07/2022	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