 <p>República de Colombia Gobernación de Santander</p>	<p><b>MANUAL PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y FECALIS EN ALIMENTOS POR EL MÉTODO DE RECuento EN PLACA SEGÚN ICMSF</b></p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-73
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	1 de 12


*República de Colombia*



*Gobernación de Santander*

# MANUAL PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y FECALIS EN ALIMENTOS POR EL MÉTODO DE RECuento EN PLACA POR SEGÚN ICMSF


Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Sandra Isabel Bohórquez Ayde López Sánchez	Ayde López Sánchez	Alejandra Galvis Vargas

	<b>MANUAL PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES EN ALIMENTOS POR EL MÉTODO DE RECuento EN PLACA SEGÚN ICMSF</b>	CÓDIGO	MI-GS-MA-73
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	2 de 12

## TABLA DE CONTENIDO

1. OBJETIVO.....	3
2. ALCANCE .....	3
3. RESPONSABILIDADES.....	3
4. DEFINICIONES.....	3
5. CONDICIONES GENERALES .....	4
6. FUNDAMENTO DEL MÉTODO DE ENSAYO.....	4
7. LIMITACIONES E INTERFERENCIAS .....	5
8. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA .....	5
9. CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA .....	5
10. EQUIPOS, REACTIVOS, CONTROLES Y MATERIAL DE REFERENCIA .....	5
10.1 Equipos .....	5
10.2 Reactivos.....	6
10.3 Controles (si aplica).....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
10.4 Material de referencia (si aplica) .....	6
11. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO .....	6
12. CONTROL DE CALIDAD ANÁLITICO.....	7
13. ANÁLISIS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS.....	8
14. EMISIÓN DEL INFORME DE RESULTADOS.....	10
15. EXÁMENES COMPLEMENTARIOS .....	10
16. DOCUMENTOS DE REFERENCIA .....	10

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Sandra Isabel Bohórquez Ayde López Sánchez	Ayde López Sánchez	Alejandra Galvis Vargas

	<b>MANUAL PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES EN ALIMENTOS POR EL MÉTODO DE RECuento EN PLACA SEGÚN ICMSF</b>	CÓDIGO	MI-GS-MA-73
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	3 de 12

17. ANEXOS ..... 10

18. CONTROL DE CAMBIOS ..... 12

## 1. OBJETIVO

Describir la metodología llevada a cabo por el laboratorio para la determinación de Coliformes Totales y Fecales presentes en los alimentos por el método de recuento en placa según la Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)

## 2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica para realizar el recuento de coliformes totales y fecales en alimentos susceptibles a contaminación por este tipo de microorganismos aplicando el método de recuento en placa.

## 3. RESPONSABILIDADES

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

## 4. DEFINICIONES


**Agar Cromogénico:** medio de cultivo que utiliza cromógenos (agentes colorantes que permite diferenciar las colonias bacterianas según actividad enzimática).

**Coliformes:** Son bacilos cortos, Gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa a 35°C, con producción de ácido y gas en menos de 48 horas.

Incluye los géneros más frecuentes *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*, menos frecuentes algunas especies de *Hafnia* y *Serratia*. Aunque considerados como evidencia de contaminación fecal, se ha demostrado que pueden vivir y crecer en el suelo, el agua y otros ambientes. Se consideran un excelente indicador de la eficiencia de los procesos de limpieza y desinfección, así como de la calidad sanitaria del agua, vegetales y muchos productos procesados.

**Coliformes fecales:** Son de origen estrictamente fecal y también fermentan la lactosa a 44.5°C con producción de ácido y gas. Se consideran el indicador más

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Sandra Isabel Bohórquez Ayde López Sánchez	Ayde López Sánchez	Alejandra Galvis Vargas

	<b>MANUAL PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES EN ALIMENTOS POR EL MÉTODO DE RECuento EN PLACA SEGÚN ICMSF</b>	CÓDIGO	MI-GS-MA-73
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	4 de 12

adecuado de contaminación con heces de animales y humanos, en pescados y mariscos, carnes, leche y alimentos.

## 5. CONDICIONES GENERALES

- Las muestras se deben analizar en cuarto de siembra y en cabina de seguridad biológica (CSB).
- El personal debe realizar el lavado de las manos antes y después de la actividad laboral.
- Utilizar los elementos de protección personal (EPPs) requeridos según el riesgo de exposición en el área, tales como: Bata de laboratorio desechable, Cubrebocas, Guantes de nitrilo, Gorro desechable, Gafas de bioseguridad. Los EPPs se pueden contaminar durante la actividad, por lo tanto, se debe restringir el uso al área de trabajo para evitar la propagación de microorganismos hacia áreas ajenas al laboratorio, la verificación de los EPPs podrá realizarse en cualquier instante y se registrará en el formato de verificación de uso de elementos de protección personal MI-GS-RG-378.
- El uso de esta prueba es para control microbiológico exclusivamente, se deben cumplir con las normas de bioseguridad. Los medios de cultivo utilizados para esta prueba son irritantes para los ojos, piel y el sistema respiratorio.


## 6. FUNDAMENTO DEL MÉTODO DE ENSAYO

El agar cromogénico para coliformes, es un medio de cultivo cromógeno diferencial para el análisis microbiológico de alimentos y superficies. En un plazo de 24 horas este medio permite la detección, la diferenciación y la enumeración simultáneas de *E. coli* y bacterias coliformes. La detección de los Coliformes totales y *E. coli* se logra mediante la combinación de dos sustratos cromogénicos

El recuento de coliformes totales se basa en la capacidad de la enzima  $\beta$ -D-galactosidasa, en desdoblar el sustrato  $\beta$ -D-GAL que es característica de las bacterias coliformes, para romper el sustrato Salmon-GAL. La reacción produce colonias de coliformes de color rojo que pueden ser rojo asalmonado.

El recuento de *E. coli* se basa en la escisión de los sustratos X-glucurónido por la  $\beta$ -D-glucuronidasa y Salmon-GAL por la  $\beta$ -D-galactosidasa, una combinación enzimática que es característica de *E. coli*. Cuando hay *E. coli* presente se rompen los dos sustratos, lo que da lugar a colonias que adquieren un color entre azul oscuro y violeta en oposición al rojo asalmonado de otras colonias de bacterias

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Sandra Isabel Bohórquez Ayde López Sánchez	Ayde López Sánchez	Alejandra Galvis Vargas

	<b>MANUAL PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES EN ALIMENTOS POR EL MÉTODO DE RECuento EN PLACA SEGÚN ICMSF</b>	CÓDIGO	MI-GS-MA-73
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	5 de 12

coliformes. Las bacterias no coliformes aparecen como colonias incoloras o, con baja frecuencia, de color turquesa. La formulación de los agares cromogenicos para coliformes y *E.coli* contiene, como inhibidor de las bacterias grampositivas, heptadecilsulfato sódico (por ejemplo, Tergitol 7), que no tiene efectos negativos sobre el crecimiento de *E. coli* ni de las bacterias coliformes que se desean cultivar.

## 7. LIMITACIONES E INTERFERENCIAS

Algunas cepas patógenas, típicamente *Escherichia coli* O157:H7, suelen ser negativas para la glucuronidasa y, por lo tanto, no producirán colonias moradas en este medio.

## 8. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras serán recolectadas por el personal capacitado y con las competencias para esta actividad, ver manual de procedimientos para toma, remisión, transporte, almacenamiento y conservación de muestras, unidad de vigilancia de factores de riesgo del ambiente y el consumo salud pública de Santander MI-GS-MA-58 capítulo 9.2. Toma, Recepción, Conservación Y Transporte De Muestras De Alimentos Y Bebidas Alcohólicas.

## 9. CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA


La muestra se conserva de acuerdo a la naturaleza del producto manteniendo las temperaturas de almacenamiento correspondientes. Ver manual de procedimientos para toma, remisión, transporte, almacenamiento y conservación de muestras, unidad de vigilancia de factores de riesgo del ambiente y el consumo salud pública de Santander MI-GS-MA-58 Cuadro 2. LABORATORIO DE ALIMENTOS: Obtención, envío y conservación de muestras para análisis Microbiológico y Fisicoquímico de alimentos.

## 10. EQUIPOS, REACTIVOS, CONTROLES Y MATERIAL DE REFERENCIA

### 10.1 Equipos y materiales

- Autoclave
- Balanza analítica
- Cabina de flujo laminar

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Sandra Isabel Bohórquez Ayde López Sánchez	Ayde López Sánchez	Alejandra Galvis Vargas

	<b>MANUAL PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES EN ALIMENTOS POR EL MÉTODO DE RECUENTO EN PLACA SEGÚN ICMSF</b>	CÓDIGO	MI-GS-MA-73
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	6 de 12

- Cajas de Petri de 90 mm o 100 mm
- Frascos schott
- Gradillas
- Homogenizador de muestras
- Incubadora a 35°C +/- 2° C
- Micropipetas de 100 a 1000 µl
- Puntas estériles
- Tubos tapa rosca estériles

## 10.2 Reactivos

- Agar Chromocult
- Agua peptonada estéril

## 10.3 Material de referencia

Cepas de referencia:


*Escherichia coli* ATCC 25922

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 o ATCC 6538

## 11. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

1. Desinfectar con alcohol al 70% el sitio por donde se vaya a extraer la muestra.
2. Rotular las bolsas 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 la bolsa previamente marcado de dilución que contiene 90 ml de

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Sandra Isabel Bohórquez Ayde López Sánchez	Ayde López Sánchez	Alejandra Galvis Vargas

	<b>MANUAL PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES EN ALIMENTOS POR EL MÉTODO DE RECuento EN PLACA SEGÚN ICMSF</b>	CÓDIGO	MI-GS-MA-73
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	7 de 12

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 peptonada 0.1%, agitar cuidadosamente

NOTA: Repetir desde el paso 7 tomando la dilución inmediatamente anterior hasta obtener la dilución necesaria; cada dilución sucesiva disminuirá 10 veces la concentración

8. 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  $10^{-2}$ .

NOTA: Si es necesario, se repite el procedimiento con más diluciones, empleando una nueva pipeta para cada dilución decimal.

9. Agregar a cada una de las cajas 10 a 15 ml de agar Chromocult 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.

10. Una vez solidificado el medio de cultivo invertir las placas e incubarlas a  $35^{\circ} \text{C} \pm 2$  durante 18 – 24 horas.


Después de la incubación examinar las placas para ver la presencia de colonias típicas de Coliformes Totales y Fecales.

## 12. CONTROL DE CALIDAD ANÁLITICO

Para comprobar la capacidad del laboratorio para detectar Coliformes Totales y Fecales realizar los siguientes controles:

- Control de esterilidad del medio de cultivo de Chromocult, incubando una caja a la temperatura del método.
- Control de esterilidad del agua peptonada sembrando 1 mL en Agar Chromocult
- Control positivo: con una cepa de *E. coli* ATCC 25922.
- Control negativo: sembrando una cepa de *S. aureus* ATCC 25923 o ATCC 6538

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Sandra Isabel Bohórquez Ayde López Sánchez	Ayde López Sánchez	Alejandra Galvis Vargas

	<b>MANUAL PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES EN ALIMENTOS POR EL MÉTODO DE RECuento EN PLACA SEGÚN ICMSF</b>	CÓDIGO	MI-GS-MA-73
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	8 de 12

### 13. ANÁLISIS 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.

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 la hoja 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:

donde:

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

$\sum C$  = 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

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Sandra Isabel Bohórquez Ayde López Sánchez	Ayde López Sánchez	Alejandra Galvis Vargas



	<b>MANUAL PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES EN ALIMENTOS POR EL MÉTODO DE RECuento EN PLACA SEGÚN ICMSF</b>	CÓDIGO	MI-GS-MA-73
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	9 de 12

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

El número se debe aproximar al siguiente decena o centena de entero, por encima o igual a 5 se aproximara por arriba; menor de 5 por abajo ej : 1295.5 se aproximara a 1300 ufc/g o ml

Si en la fórmula me hubiese dado, por ejemplo:

1254 el recuento final será :1200 ufc/g o ml

1255 el recuento final será :1300 ufc/g o ml

654 el recuento final será 650 ufc/g o ml

656 el recuento final será 660 ufc/g o ml

14 el recuento final será 10 ufc/g o ml

15 el recuento final será 20 ufc/g o ml

15525 el recuento final será 15000 ufc/g o ml

15555 el recuento final será 16000 ufc/g o ml

Si solo se observa crecimiento en una dilución se utiliza la siguiente fórmula, teniendo en cuenta lo anteriormente explicado:

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


Ejemplo:

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

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

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

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Sandra Isabel Bohórquez Ayde López Sánchez	Ayde López Sánchez	Alejandra Galvis Vargas

	<b>MANUAL PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y FCALES EN ALIMENTOS POR EL MÉTODO DE RECUESTO EN PLACA SEGÚN ICMSF</b>	CÓDIGO	MI-GS-MA-73
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	10 de 12

Informar el resultado en unidades formadoras de colonia ufc/ g o ml de acuerdo al producto analizado. Si no se observan colonias después de 24 horas de incubación se reporta como menor de 10 ufc/g o ml.

#### 14. 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.


#### 15. EXÁMENES COMPLEMENTARIOS

No se requieren exámenes complementarios.

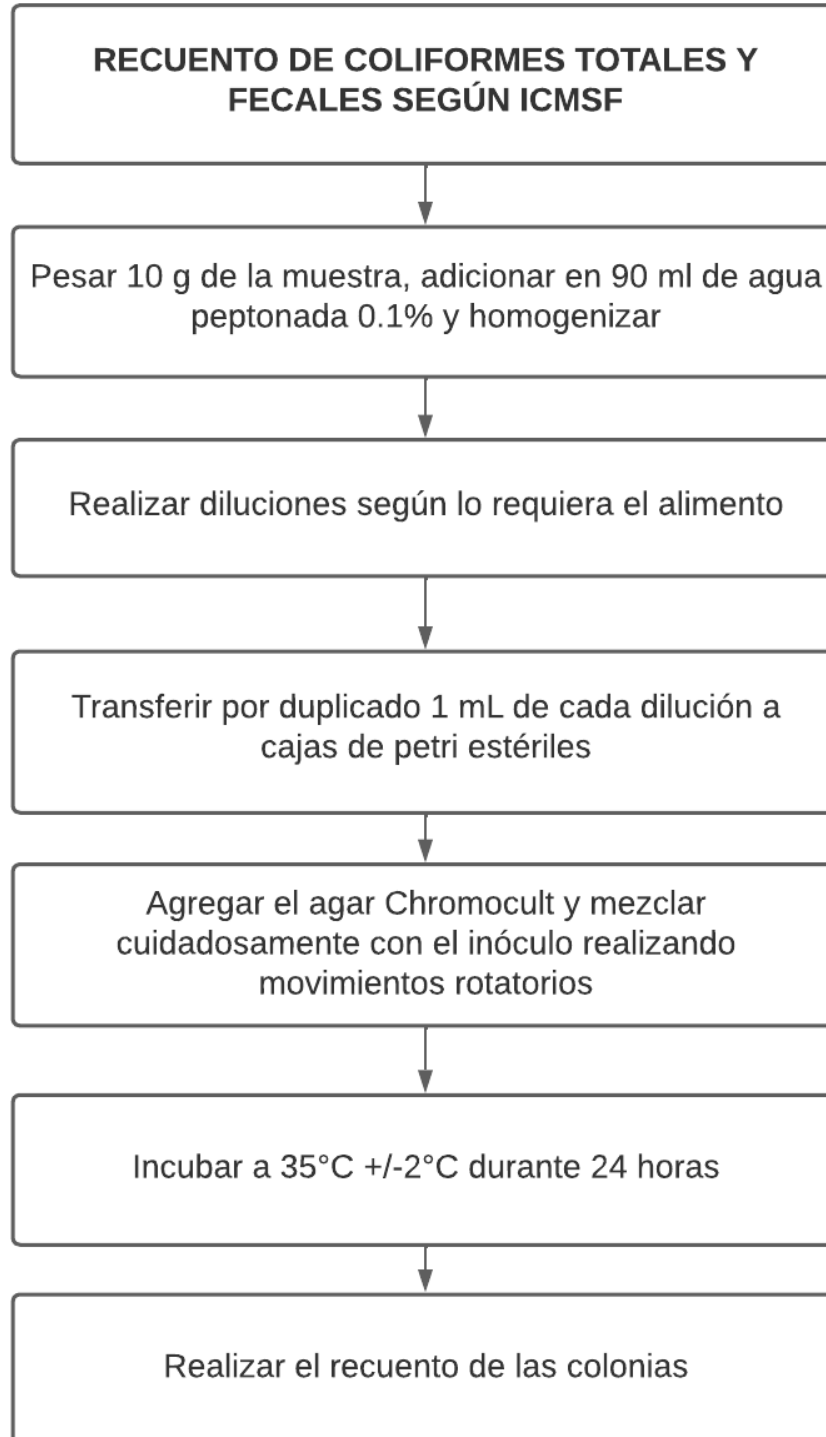
#### 16. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

- MERCK, Manual de Medios de Cultivo. 1994
- 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
- Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica ANMAT Guía de Interpretación de Resultados Microbiológicos de Alimentos


Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Sandra Isabel Bohórquez Ayde López Sánchez	Ayde López Sánchez	Alejandra Galvis Vargas

	<b>MANUAL PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES EN ALIMENTOS POR EL MÉTODO DE RECuento EN PLACA SEGÚN ICMSF</b>	CÓDIGO	MI-GS-MA-73
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	11 de 12

## 17. ANEXOS



Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Sandra Isabel Bohórquez Ayde López Sánchez	Ayde López Sánchez	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia Gobernación de Santander</p>	<b>MANUAL PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES EN ALIMENTOS POR EL MÉTODO DE RECUENTO EN PLACA SEGÚN ICMSF</b>	CÓDIGO	MI-GS-MA-73
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	12 de 12

## 18. CONTROL DE CAMBIOS

CONTROL DE CAMBIOS				
VERSIÓN	FECHA	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO	REVISÓ	APROBÓ
0	28/06/2023	Emisión inicial del documento	Alba Rocío Orduz Amézquita <b>Líder Grupo LDSP</b>  German Eduardo Marín Cárdenas <b>Director de Salud Integral</b>  Diego Sánchez Báez <b>Coordinador Grupo de Apoyo a la Gestión y Calidad</b>  César Ernesto Sánchez Aranda <b>Director de Planeación y Mejoramiento en Salud</b>	Javier Alonso Villamizar Suarez <b>Secretario de Salud de Santander</b>

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Sandra Isabel Bohórquez Ayde López Sánchez	Ayde López Sánchez	Alejandra Galvis Vargas