	MANUAL DE RECUENTO DE AEROBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES TOTALES, E. COLI, MOHOS Y LEVADURAS, ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS, BACILLUS CEREUS Y ENTEROBACTERIAS MEDIANTE EL SISTEMA TEMPO	CÓDIGO	MI-GS-MA-93
		VERSIÓN	1
		FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PÁGINA	1 de 17

República de Colombia



Gobernación de Santander

MANUAL DE RECUENTO DE AEROBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES TOTALES, E. COLI, MOHOS Y LEVADURAS, ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS, BACILLUS CEREUS Y ENTEROBACTERIAS MEDIANTE EL SISTEMA TEMPO

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
1	Sandra Isabel Bohórquez	Aydé López Sánchez	Jenny Osma



	MANUAL DE RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES TOTALES, E. COLI, MOHOS Y LEVADURAS, ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS, BACILLUS CEREUS y ENTEROBACTERIAS MEDIANTE EL SISTEMA TEMPO	CÓDIGO	MI-GS-MA-93
		VERSIÓN	1
		FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PÁGINA	2 de 17

TABLA DE CONTENIDO

1. OBJETIVO.....	3
2. ALCANCE	3
3. RESPONSABILIDADES	3
4. DEFINICIONES	3
5. CONDICIONES GENERALES.....	5
6. FUNDAMENTO DEL MÉTODO DE ENSAYO	6
7. LIMITACIONES E INTERFERENCIAS	7
8. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA.....	7
9. CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA.....	7
10. EQUIPOS, REACTIVOS, CONTROLES Y MATERIAL DE REFERENCIA.....	8
10.1 EQUIPOS Y MATERIALES	8
10.2 REACTIVOS.....	8
10.3 CONTROLES	8
10.4 MATERIAL DE REFERENCIA.....	8
11 DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO.....	9
11.1 MUESTRAS DE ALIMENTOS.....	9
11.2 MUESTRAS AMBIENTALES	11
12 CONTROL DE CALIDAD ANÁLITICO	11
13 ANÁLISIS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS	13
14 EMISIÓN DEL INFORME DE RESULTADOS	14
15 EXÁMENES COMPLEMENTARIOS.....	14
16 DOCUMENTOS DE REFERENCIA.....	14
18. CONTROL DE CAMBIOS	15
19. ANEXO.....	16

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
1	Sandra Isabel Bohórquez	Aydé López	Jenny Osma

	MANUAL DE RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES TOTALES, E. COLI, MOHOS Y LEVADURAS, ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS, BACILLUS CEREUS y ENTEROBACTERIAS MEDIANTE EL SISTEMA TEMPO	CÓDIGO	MI-GS-MA-93
		VERSIÓN	1
		FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PÁGINA	3 de 17

1. OBJETIVO

Describir el procedimiento para el recuento de aerobios mesófilos, coliformes totales, *Escherichia coli*, mohos, levaduras, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y Enterobacterias a partir de muestras de alimentos y muestras ambientales por el método automatizado Tempo® utilizando kits Tempo para cada microorganismo.

2. ALCANCE

Este procedimiento se empleará para el recuento de microorganismos en muestras de alimentos; aplica para todos los alimentos que por su origen, naturaleza, composición y manipulación pueden ser susceptibles de contaminación con aerobios mesófilos, coliformes totales, *Escherichia coli*, mohos, levaduras, *Staphylococcus coagulasa* positiva, *Bacillus cereus* y Enterobacterias.


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


- **AEROBIOS MESÓFILOS:** En este grupo se incluyen todos 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 40°C. El recuento de este tipo 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.
- **BACILLUS CEREUS:** La capacidad de esporular es una característica importante, porque estas estructuras confieren a la bacteria resistencia a condiciones adversas, de esta manera pueden seguir viables a pesar de que las células vegetativas hayan sido destruidas.
- **COLIFORMES TOTALES:** son bacterias que se pueden encontrar en el ambiente. Aunque su presencia no indica necesariamente contaminación fecal, revelan que el alimento estuvo expuesto a una contaminación general (utensilios sucios, cocción insuficiente, etc).
- **ENTEROBACTERIAS:** La familia Enterobacteriaceae es una advertencia importante en la industria alimentaria ya que incluye tanto patógenos intestinales como importantes agentes de deterioro de los alimentos y sigue siendo uno de los Indicadores de higiene y seguridad alimentaria más utilizados. Aunque a muchos miembros no se les conoce como patógenos, la familia Enterobacteriaceae incluye

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
1	Sandra Isabel Bohórquez	Aydé López	Jenny Osma

	MANUAL DE RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES TOTALES, E. COLI, MOHOS Y LEVADURAS, ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS, BACILLUS CEREUS y ENTEROBACTERIAS MEDIANTE EL SISTEMA TEMPO	CÓDIGO	MI-GS-MA-93
		VERSIÓN	1
		FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PÁGINA	4 de 17

- numerosas especies como *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* y *Escherichia coli*, que puede causar una amplia gama de enfermedades humanas.
- **ESCHERICHIA COLI:** Microorganismo indicador importante dentro del grupo de las Enterobacterias. La presencia de este patógeno en un alimento, es signo de mala calidad higiénica en el proceso, falta de higiene de los manipuladores y contaminación fecal.
- **ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVA:** bacteria que forma colonias típicas o atípicas en la superficie de un medio de cultivo selectivo y que da una reacción positiva para la prueba de la coagulasa. La presencia en los alimentos está relacionada con las prácticas de limpieza e higiene.
- **MOHOS Y LEVADURAS:** La importancia de la presencia de mohos y levaduras en los alimentos está determinada por la capacidad de producir diferentes grados de deterioro y descomposición de los mismos. Además, los hongos producen metabolitos tóxicos conocidos como micotoxinas, compuestos estables que no se destruyen durante el procesamiento de alimentos, por lo que son responsables de intoxicación.
- **SISTEMA TEMPO:** Automatiza el recuento de indicadores de calidad en productos alimenticios, proporciona resultados precisos y reduce los tiempos de preparación de la muestra, se compone de la estación de preparación para el llenado de las tarjetas y de la estación de lectura para determinar el número de UFC/gramos o mililitros de muestra.
- **TARJETAS TEMPO:** es una miniaturización del método del Número más Probable, (NMP) que contiene 48 pocillos de tres volúmenes diferentes. La tarjeta contiene 3 grupos de 16 pocillos (pequeños, medianos y grandes), con una diferencia de volumen en cada grupo de pocillos de un logaritmo. La tarjeta está diseñada para simular el método del número más probable (MPN). La tarjeta se sella herméticamente para evitar cualquier riesgo de contaminación durante la manipulación posterior.
- **TEMPO AC:** (Aerobic Count) es un ensayo automatizado para su uso exclusivo con el sistema TEMPO® destinado al recuento de flora aerobia mesófila viable en productos alimenticios.
- **TEMPO BC:** es un ensayo automatizado que se realiza en el sistema TEMPO® y está destinado al recuento del grupo *Bacillus cereus* en 22-27 horas en productos alimenticios.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
1	Sandra Isabel Bohórquez	Aydé López	Jenny Osma


	MANUAL DE RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES TOTALES, E. COLI, MOHOS Y LEVADURAS, ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS, BACILLUS CEREUS y ENTEROBACTERIAS MEDIANTE EL SISTEMA TEMPO	CÓDIGO	MI-GS-MA-93
		VERSIÓN	1
		FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PÁGINA	5 de 17

- **TEMPO EC:** (E. coli) es un ensayo automatizado para utilizar con el sistema TEMPO®, destinado al recuento de *Escherichia coli* en 22-27 horas en productos alimenticios.
- **TEMPO EB:** (Enterobacterias): es un ensayo automatizado para utilizar con el sistema TEMPO®, destinado al recuento de Enterobacterias en 22-27 horas en productos alimenticios.
- **TEMPO STA:** está destinado al recuento del grupo de estafilococos coagulasa-positivos (*Staphylococcus aureus*) en 24-27 horas en productos alimenticios
- **TEMPO TC:** (Total Coliforms) es un ensayo automatizado que se utiliza con el sistema TEMPO para el recuento en 24 horas de coliformes totales en productos alimenticios.
- **TEMPO YM:** (Levaduras/Mohos) es un test automatizado para su uso en el sistema TEMPO, destinado al recuento de levaduras y mohos en 72-76 horas en productos alimenticios.

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 MI-GS-RG-173 LISTA DE CHEQUEO DE BIOSEGURIDAD, MANEJO Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS
- El uso de esta prueba es para control microbiológico exclusivamente, se deben cumplir con las normas de bioseguridad.
- Todas las muestras y los medios inoculados deben considerarse infecciosos y manipularse adecuadamente.
- Durante todo el procedimiento deben manipularse las muestras asépticamente y tener las precauciones habituales de manipulación del grupo bacteriano objeto de estudio.
- Utilice únicamente los medios de cultivo que tengan un aspecto homogéneo (sin grumos y sin humedad). Antes de usarlos, compruebe que el envase y los

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
1	Sandra Isabel Bohórquez	Aydé López	Jenny Osma

	MANUAL DE RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES TOTALES, E. COLI, MOHOS Y LEVADURAS, ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS, BACILLUS CEREUS y ENTEROBACTERIAS MEDIANTE EL SISTEMA TEMPO	CÓDIGO	MI-GS-MA-93
		VERSIÓN	1
		FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PÁGINA	6 de 17

componentes están intactos.

- No utilice tarjetas visiblemente deterioradas.
- No permita que la muestra entre en contacto directo con el medio de cultivo (en forma pulverulenta) antes de que se haya reconstituido el medio.

Los kits de cada prueba deben almacenarse en las siguientes condiciones:


Tabla 1. Condiciones de almacenamiento de los kits de TEMPO

Kit	Temperatura de almacenamiento
TEMPO® AC	+2 °C/+25 °C.
TEMPO® TC	+2 °C/+25 °C.
TEMPO® EC	+2 °C/+25 °C.
TEMPO YM	2-8 °C.
TEMPO® STA	+2 °C/+25 °C.
TEMPO® BC	+2 °C/+8 °C.
TEMPO® EB	+2 °C/+8 °C.

6. FUNDAMENTO DEL MÉTODO DE ENSAYO

- **Aerobios mesófilos, mohos y levaduras y Bacillus cereus:** Los microorganismos presentes en la tarjeta reducen el sustrato en el medio de cultivo durante la incubación y hacen que aparezca una señal fluorescente, que es detectada por el lector (equipo TEMPO® Reader).
- **Coliformes totales y Staphylococcus aureus:** El medio de cultivo contiene un indicador de pH fluorescente que, cuando el pH es neutro, emite una señal que detecta el equipo TEMPO® Reader. Los coliformes totales y estafilococos presentes en la tarjeta asimilan los nutrientes del medio de cultivo durante la incubación, lo que da lugar a un descenso del pH y a la extinción de la señal fluorescente.
- **Enterobacterias:** El medio de cultivo contiene un indicador de pH fluorescente que, cuando su pH es neutro, emite una señal detectada por el TEMPO Reader. Las enterobacterias presentes en la tarjeta asimilan los nutrientes del medio de cultivo durante la incubación, provocando una disminución del pH y la extinción de la señal fluorescente. Dependiendo del número y tipo de pocillos positivos, el sistema TEMPO calcula el número de enterobacterias presentes en la muestra original según un cálculo basado en el método NMP.
- **Escherichia coli:** En función de la actividad de la β -glucuronidasa, las *Escherichia coli* presentes en la tarjeta reducen el sustrato del medio de cultivo durante la incubación y se emite una señal fluorescente, detectada por el lector TEMPO®

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
1	Sandra Isabel Bohórquez	Aydé López	Jenny Osma

	MANUAL DE RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES TOTALES, E. COLI, MOHOS Y LEVADURAS, ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS, BACILLUS CEREUS y ENTEROBACTERIAS MEDIANTE EL SISTEMA TEMPO	CÓDIGO	MI-GS-MA-93
		VERSIÓN	1
		FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PÁGINA	7 de 17

Reader.

7. LIMITACIONES E INTERFERENCIAS

- Si la tarjeta no se llena correctamente, podrían producirse resultados no válidos (presencia de pocillos vacíos o restos de líquido en el vial después del ciclo de llenado): por ejemplo, por el uso de una bolsa con filtro distinta de la recomendada.
- Una preparación o un almacenamiento inadecuados de las muestras pueden provocar resultados erróneos.
- La señal fluorescente puede verse afectada si la dilución primaria tiene un color intenso, por ejemplo, en matrices de alimentos como purés de frutas y cacao, se recomienda una dilución de estas matrices equivalente, como mínimo, a 1/400.
- No es aconsejable utilizar tempo EC para productos con actividad enzimática elevada ejemplo: moluscos crudos, ni tempo YM para el recuento en yogures.
- El sistema TEMPO® no ha sido validado para el recuento de microorganismos en agua, y bebidas gaseosas.
- El parámetro TEMPO EB se evaluó utilizando numerosas matrices de alimentos, excluyendo refrescos. Sin embargo, dada la diversidad de matrices de alimentos y procesos de fabricación, los usuarios deben verificar que la composición de las matrices probadas no afecte la precisión de los resultados. En particular, la señal fluorescente puede verse afectada si la dilución primaria tiene un color intenso o si adquiere color durante la incubación en la tarjeta debido a una reacción de oxidación: para TEMPO Prueba EB, una dilución se recomienda que estas matrices sean al menos equivalentes a 1/400.


8. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras serán recolectadas por el personal capacitado y con las competencias para esta actividad, ver MI-GS-MA-58 MANUAL DE LA UNIDAD DE VIGILANCIA DE FACTORES DE RIESGO DEL AMBIENTE Y EL CONSUMO PARA TOMA, REMISIÓN, TRANSPORTE, ALMACENAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS 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 MI-GS-MA-58 MANUAL DE LA UNIDAD DE VIGILANCIA DE FACTORES DE RIESGO DEL AMBIENTE Y EL CONSUMO PARA TOMA, REMISIÓN, TRANSPORTE, ALMACENAMIENTO Y

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
1	Sandra Isabel Bohórquez	Aydé López	Jenny Osma

	MANUAL DE RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES TOTALES, E. COLI, MOHOS Y LEVADURAS, ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS, BACILLUS CEREUS y ENTEROBACTERIAS MEDIANTE EL SISTEMA TEMPO	CÓDIGO	MI-GS-MA-93
		VERSIÓN	1
		FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PÁGINA	8 de 17

CONSERVACIÓN DE MUESTRAS Cuadro 2. LABORATORIO DE ALIMENTOS: Obtención, envío y conservación de muestras para análisis Microbiológico y Físicoquímico de alimentos.

10. EQUIPOS, REACTIVOS, CONTROLES Y MATERIAL DE REFERENCIA

10.1 EQUIPOS Y MATERIALES

- Agitador vórtex
- Balanza
- Bolsas con filtro Tempo
- Homogeneizador de muestras
- Incubadora 25° C ± 1° C
- Incubadora 30°C ± 1° C
- Incubadora 35°C ± 1° C
- Incubadora 37° C ± 1° C
- Tempo Filler
- Tempo Reader
- Micropipetas de 100 a 1000 uL
- Dispensador de 1 a 5 mL
- Puntas estériles
- Frascos Schott

10.2 REACTIVOS

- Agua destilada estéril
- Agua peptonada 0,1%
- Kit Tempo AC
- Kit Tempo TC
- Kit Tempo EC
- Kit Tempo YM
- Kit Tempo STA
- Kit Tempo BC
- Kit Tempo EB


10.3 CONTROLES

Tempo QC

10.4 MATERIAL DE REFERENCIA

- Bacillus cereus 11778
- Escherichia coli 25922

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
1	Sandra Isabel Bohórquez	Aydé López	Jenny Osma

	MANUAL DE RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES TOTALES, E. COLI, MOHOS Y LEVADURAS, ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS, BACILLUS CEREUS y ENTEROBACTERIAS MEDIANTE EL SISTEMA TEMPO	CÓDIGO	MI-GS-MA-93
		VERSIÓN	1
		FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PÁGINA	9 de 17

- Enterococcus faecalis ATCC® 29212
- Staphylococcus aureus 25923 - 6538
- Sacharomyces cerevisiae 9763
- Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

11 DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

11.1 MUESTRAS DE ALIMENTOS

- Desinfectar con alcohol al 70% el sitio donde se vaya a extraer la muestra.
- Rotular las bolsas Tempo con su respectivo número de muestra
- Abrir aséptica y adecuadamente la muestra.
- Preparar la muestra: macerar, picar, mezclar y pesar 10 g representativos de la muestra total, en la bolsa previamente marcada con la dilución que contiene 90 ml de agua peptonada 0.1%, en una balanza previamente tarada, para obtener una dilución 10-1.






- Iniciar sesión en la estación de preparación Tempo (Tempo prep)  y posteriormente dar clic en  o presionar F8 para registrar las muestras con el código asignado en el laboratorio y el nombre de la muestra. Escanear el código de barras de los viales de cada tipo de prueba a realizar (1 vial por microorganismo a evaluar).
- Reconstituir el medio de cultivo agregando el diluyente secundario (agua destilada estéril) con ayuda del dispensador de la siguiente manera:

Tabla 2. Cantidad de agua destilada estéril a agregar por cada kit de TEMPO

Kit	Cantidad de agua destilada estéril
Tempo AC	3 mL
Tempo TC	
Tempo EB	
Tempo EC	
Tempo YM	
Tempo STA	3,9 mL
Tempo BC	

El volumen final de los viales con el medio reconstituido y la muestra es de 4 mL

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
1	Sandra Isabel Bohórquez	Aydé López	Jenny Osma

	MANUAL DE RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES TOTALES, E. COLI, MOHOS Y LEVADURAS, ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS, BACILLUS CEREUS y ENTEROBACTERIAS MEDIANTE EL SISTEMA TEMPO	CÓDIGO	MI-GS-MA-93
		VERSIÓN	1
		FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PÁGINA	10 de 17

- Tomar muestra de la bolsa Tempo y transferirla a los viales que contienen el medio de cultivo reconstituido: para aerobios mesófilos, coliformes totales, E. coli, Enterobacterias, mohos y levaduras tomar 1 mL de muestra que corresponde a una dilución 1/40 y para *Bacillus cereus* y *Staphylococcus coagulasa positiva* tomar 100 uL para una dilución de 1/400. Agitar en vortex de 3 a 5 segundos.

Nota: El intervalo entre la homogeneización de la dilución primaria y su transferencia a la tarjeta TEMPO® no debe superar los **45 minutos**.

- Tomar una tarjeta por cada vial de medio inoculado y comprobar que los colores y las abreviaturas de los kits coincidan con el vial, vincule las tarjetas a la muestra registrada escaneando el código de barras de la tarjeta, verifique que la dilución sea la correcta.

Tabla 3. Dilución correspondiente a cada tarjeta TEMPO


Tarjetas	Dilución
Tempo AC	1/40
Tempo TC	
Tempo EB	
Tempo EC	
Tempo YM	
Tempo STA	1/400
Tempo BC	

- Poner los viales en la gradilla de llenado, insertar la tarjeta en la ranura frente al vial y simultáneamente insertar el tubo de transferencia de la tarjeta dentro del vial.
- Abrir la puerta del Tempo Filler e insertar la gradilla, oprimir el botón start para iniciar el ciclo de llenado.
- El medio inoculado se aspira por completo en la tarjeta. Después de completarse el llenado de las tarjetas, el TEMPO® Filler corta y sella los tubos de transferencia.

Nota: El ciclo de llenado es el mismo para todos los parámetros y permite llenar al mismo tiempo tarjetas para parámetros diferentes.

- Retirar la gradilla de llenado del TEMPO® Filler y comprobar visualmente que los viales estén vacíos.
- Extraer las tarjetas de la gradilla y transferirlas a las gradillas de incubación: introduzca las tarjetas en las ranuras, con sus etiquetas orientadas hacia usted (hacia el asa de la gradilla). Las tarjetas que tengan que incubarse a la misma temperatura y sean del mismo parámetro a evaluar deben agruparse en la misma

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
1	Sandra Isabel Bohórquez	Aydé López	Jenny Osma

	MANUAL DE RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES TOTALES, E. COLI, MOHOS Y LEVADURAS, ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS, BACILLUS CEREUS y ENTEROBACTERIAS MEDIANTE EL SISTEMA TEMPO	CÓDIGO	MI-GS-MA-93
		VERSIÓN	1
		FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PÁGINA	11 de 17

gradilla.

- Incubar las tarjetas para cada parámetro de la siguiente manera:

Tabla 4. Temperatura y tiempo de incubación de las tarjetas de cada kit de TEMPO

Tarjeta	Temperatura de incubación	Tiempo (Horas)
Tempo AC	30 °C ± 1 °C	40-48 h
Tempo TC	30 °C ± 1 °C	24-27 h
Tempo EB	35 °C ± 1 °C	22-27 h
Tempo EC	37 ± 1 °C	24-27 h
Tempo YM	25 ± 1 °C	72-76 h
Tempo STA	37 °C ± 1 °C	24-27 h
Tempo BC	30 °C ± 1 °C	22-27 h

11.2 MUESTRAS AMBIENTALES

Si llega un tubo con escobillón y el diluyente tome esta dilución como 10⁻¹

Si la muestra llega como esponja agregue 90 ml de peptona al 0.1% a la esponja y tome esta dilución como 10⁻¹

Proceda en cualquiera de los casos como se indica en el numeral 11.1 procedimiento de muestras de alimentos descrito anteriormente en este manual.


12 CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

Para asegurar que el método por el sistema Tempo se ha realizado correctamente se deben utilizar las siguientes cepas como control positivo y negativo cada semana de montaje.

Tabla 5. Controles a utilizar para cada kit de TEMPO


Kit	Control positivo	Control negativo
Tempo AC	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778
Tempo TC	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Tempo EB	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212
Tempo EC	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Tempo YM	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC® 9763	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
1	Sandra Isabel Bohórquez	Aydé López	Jenny Osma

	MANUAL DE RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES TOTALES, E. COLI, MOHOS Y LEVADURAS, ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS, BACILLUS CEREUS y ENTEROBACTERIAS MEDIANTE EL SISTEMA TEMPO	CÓDIGO	MI-GS-MA-93
		VERSIÓN	1
		FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PÁGINA	12 de 17
Tempo STA	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	
Tempo BC	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	

- Además, para confirmar que el equipo se encuentra funcionando correctamente y garantizar que las lecturas de fluorescencia son viables se utiliza mensualmente el kit Tempo QC, que consiste en 5 frascos de solución patrón y 5 tarjetas control identificadas mediante pictogramas (8 o 20).

El montaje del Tempo QC se realiza de la siguiente manera:

- Atempere el kit a temperatura ambiente
- Coloque cada frasco en la gradilla de llenado e inserte las tarjetas. Verificar que el pictograma del frasco y la tarjeta coincidan.
- Insertar la gradilla en el Tempo Filler e iniciar el ciclo de relleno-sellado.
- Retirar la gradilla del Tempo Filler y transferir las tarjetas a la gradilla de lectura ubicándolas apropiadamente en las posiciones siguientes:
- Las 3 tarjetas de 8uL en las posiciones 1,2 y 3 en la gradilla
- Las 2 tarjetas de 20 uL en las posiciones 4 y 5 de la gradilla.
- Para la lectura e interpretación, abrir la aplicación Tempo Check 
- En la estación de lectura, insertar la gradilla en el Tempo Reader y oprimir el botón Start.
- Consultar los resultados de la prueba en la pantalla de visualización oprimiendo



Los resultados se muestran de la siguiente manera:

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
1	Sandra Isabel Bohórquez	Aydé López	Jenny Osma


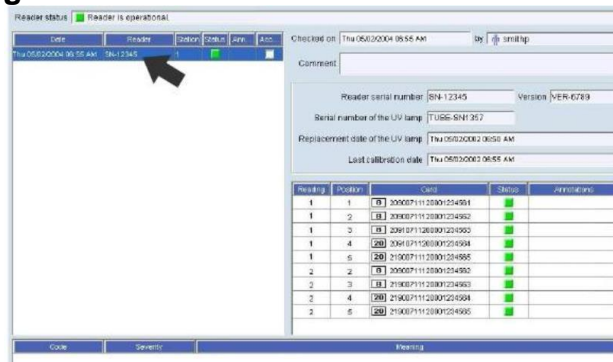
	MANUAL DE RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES TOTALES, E. COLI, MOHOS Y LEVADURAS, ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS, BACILLUS CEREUS y ENTEROBACTERIAS MEDIANTE EL SISTEMA TEMPO	CÓDIGO	MI-GS-MA-93
		VERSIÓN	1
		FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PÁGINA	13 de 17

Imagen 1: Resultados del control TEMPO QC



El lector funciona correctamente



El lector funciona correctamente, pero se debe extremar la vigilancia en los próximos controles




Indica problemas en el lector o que hay algún error en el montaje del control

Para solucionarlo revise las condiciones de almacenamiento del kit (2-8°C y no exposición directa a la luz), cambie las posiciones de las tarjetas y lea de nuevo. Si el problema persiste realice nuevamente el montaje con un nuevo lote del kit.


13 ANÁLISIS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Para la obtención de los resultados, pasado el tiempo de incubación, inicie sesión en la estación de lectura Tempo Reader.

- En la parte superior izquierda de la pantalla aparece  lo que indica que hay tarjetas que se encuentran listas para leer. Dar clic en el icono y revisar cuales son los parámetros que se deben leer.
- Seguidamente introduzca en el lector la gradilla que contiene las tarjetas y oprima el



botón de start .El lector escanea el código de barras de cada tarjeta e interpreta los resultados de fluorescencia obtenidos en cada pocillo, automáticamente se asocian con la identificación de la muestra, el tipo de análisis, la dilución y el recuento.

- Finalizado el proceso de lectura en el Tempo Reader, dar clic en  para tener acceso a los resultados que se mostrarán en pantalla de la siguiente manera

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
1	Sandra Isabel Bohórquez	Aydé López	Jenny Osma


	MANUAL DE RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES TOTALES, E. COLI, MOHOS Y LEVADURAS, ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS, BACILLUS CEREUS y ENTEROBACTERIAS MEDIANTE EL SISTEMA TEMPO	CÓDIGO	MI-GS-MA-93
		VERSIÓN	1
		FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PÁGINA	14 de 17

Imagen 2: Resultados de lectura de las tarjetas

Sample	Test	Proporcion	Py	CRUg	Status	Annotations	Validated
N-73007	EC	Wed 04/02/2004 05:31 AM	smtp	<10	Green		✓
N-73007	BC	Wed 04/02/2004 05:31 AM	smtp	<10	Green		✓

- El número de pocillos positivos obtenidos en relación con el volumen de los pocillos y la dilución de la muestra, proporciona el resultado en UFC por gramo o mililitro de muestra. Los análisis negativos se expresan <10 Ufc/g o mL de muestra y para *Bacillus cereus* y *Staphylococcus* <100 UFC/g o mL de muestra. Los resultados positivos se expresan con el valor obtenido en ufc/ g o mL de muestra. Registre los resultados del análisis en la MI-GS-RG-157 HOJA DE DATOS PRIMARIOS ÁREA DE MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS y valide los resultados en el software

oprimiendo 

14 EMISIÓN DEL INFORME DE RESULTADOS

Los resultados se emitirán en la plantilla que contiene información general del punto de toma, información de la muestra recibida y los análisis realizados. INFORME DE ANÁLISIS DE ALIMENTOS Y BEBIDAS MI-GS-RG-816.


15 EXÁMENES COMPLEMENTARIOS

- Los análisis de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus* coagulasa positivos que presenten recuento deberán confirmarse teniendo en cuenta el método manual tradicional que requiere realizar siembra por superficie en los respectivos agares para cada microorganismo y seguidamente las pruebas confirmatorias establecidas.
- Revisar el MI-GS-MA-46 MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA EL RECuento DE *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASA POSITIVA EN MUESTRAS DE ALIMENTOS SEGÚN LA NORMA ISO 6888-1: 2021 numeral 16 prueba de la coagulasa y MI-GS-MA-94 MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA EL RECuento DE *BACILLUS CEREUS* PRESUNTIVOS SEGÚN ISO 7932:2004. Técnica de recuento de colonias a 30°C según ISO 7932:2004 numeral 14 confirmación por el test de hemólisis en agar sangre.

16 DOCUMENTOS DE REFERENCIA

- BIOMÉRIEUX, Inserto TEMPO® AC (Aerobic Count), 2019
- BIOMÉRIEUX, Inserto TEMPO® BC (B. cereus), 2019
- BIOMÉRIEUX, Inserto TEMPO® EC (E. coli), 2018 BIOMÉRIEUX, Inserto TEMPO® STA 2019
- BIOMÉRIEUX, Inserto TEMPO® TC (Total Coliforms), 2018 BIOMÉRIEUX, Inserto TEMPO® YM (Levaduras/Mohos) 2015

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
1	Sandra Isabel Bohórquez	Aydé López	Jenny Osma

	MANUAL DE RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES TOTALES, E. COLI, MOHOS Y LEVADURAS, ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS, BACILLUS CEREUS y ENTEROBACTERIAS MEDIANTE EL SISTEMA TEMPO	CÓDIGO	MI-GS-MA-93
		VERSIÓN	1
		FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PÁGINA	15 de 17

- BIOMÉRIEUX, Inserto TEMPO® EB (Enterobacterias) 2010


17 NORMATIVIDAD APLICABLE

- Microbiology – General guidance for the enumeration of coliforms. Colony-count technique. NF ISO 4832 (2006)
- Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of presumptive Bacillus cereus - Colony-count technique at 30°C. EN ISO 7932 (2004)
- Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) ISO 6888
- Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds. 21527 (2008)
- Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of β-glucuronidase-positive Escherichia coli. Part 2: Colony-count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-glucuronide. ISO 16649-2
- Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique. ISO 4833-1

18. CONTROL DE CAMBIOS

CONTROL DE CAMBIOS				
VERSIÓN	FECHA	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO	REVISÓ	APROBÓ
0	08/11/2023	Emisión inicial del documento	Alba Rocío Orduz Amézquita Líder Grupo LDSP German Eduardo Marín Cárdenas Director de Salud Integral Diego Sánchez Báez Coordinador Grupo de Apoyo a la Gestión y Calidad César Ernesto Sánchez Aranda Director de Planeación y Mejoramiento en Salud	Javier Alonso Villamizar Suarez Secretario de Salud de Santander

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
1	Sandra Isabel Bohórquez	Aydé López	Jenny Osma

	MANUAL DE RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES TOTALES, E. COLI, MOHOS Y LEVADURAS, ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS, BACILLUS CEREUS y ENTEROBACTERIAS MEDIANTE EL SISTEMA TEMPO		CÓDIGO	MI-GS-MA-93
			VERSIÓN	1
			FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
			PÁGINA	16 de 17
1		Modificación del nombre del documento e Inclusion de la técnica de recuento de enterobacterias	Alba Rocío Orduz Amézquita Líder Grupo LDSP Zulema Rosalba Villarreal Directora de Salud Integral Samuel Santamaría Director de planeación y Mejoramiento en Salud	Edwin Antonio Prada Ramírez Secretario de Salud de Santander

19. ANEXO

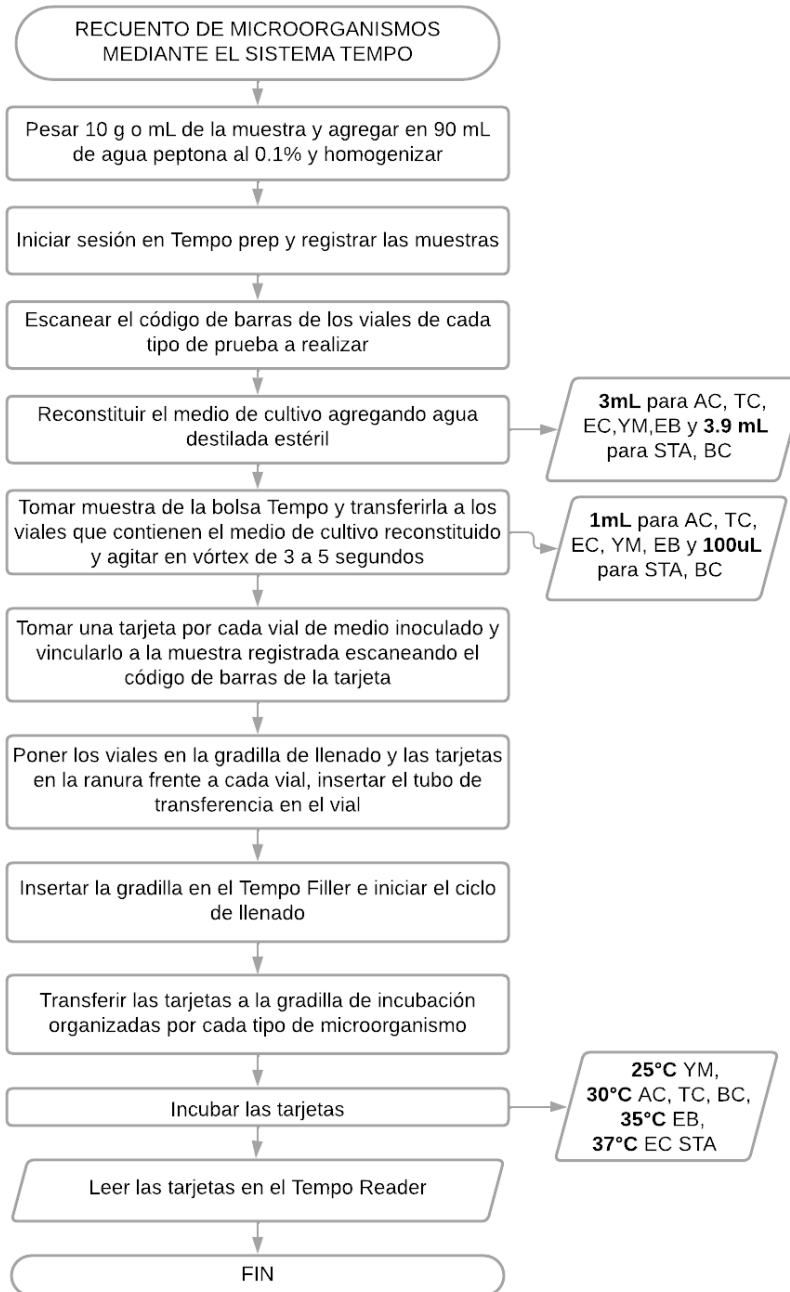
Flujograma del proceso de recuento de microorganismos mediante el sistema TEMPO

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
1	Sandra Isabel Bohórquez	Aydé López	Jenny Osma



**MANUAL DE RECuento DE AEROBIOS
MESÓFILOS, COLIFORMES TOTALES, E. COLI,
MOHOS Y LEVADURAS, ESTAFILOCOCOS
COAGULASA POSITIVOS, BACILLUS CEREUS y
ENTEROBACTERIAS MEDIANTE EL
SISTEMA TEMPO**

CÓDIGO	MI-GS-MA-93
VERSIÓN	1
FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
PÁGINA	17 de 17



Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
1	Sandra Isabel Bohórquez	Aydé López	Jenny Osma