

  	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE ENTEROBACTERIAS SEGÚN ISO 21528-2:2017	CÓDIGO	MI-GS-MA-107
		VERSIÓN	0
	LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PAGINA	Página 1 de 14

República de Colombia



Gobernación de Santander

MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE ENTEROBACTERIAS

LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA DE SANTANDER

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

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE ENTEROBACTERIAS SEGÚN ISO 21528-2:2017	CÓDIGO	MI-GS-MA-107
		VERSIÓN	0
	LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PAGINA	Página 2 de 14

TABLA DE CONTENIDO

1. OBJETIVO	4
2. ALCANCE	4
3. RESPONSABILIDADES	4
4. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS	4
5. CONDICIONES GENERALES	4
6. FUNDAMENTO DEL MÉTODO DE ENSAYO	5
7. LIMITACIONES O INTERFERENCIAS	5
8. RECOLECCION E IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA	5
9. CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA	5
10. EQUIPOS, MATERIALES, REACTIVOS Y CONTROLES.	6
10.1 EQUIPOS Y MATERIALES	6
10.2 REACTIVOS.....	6
10.3 CONTROLES	6
11. DESCRIPCION DEL PROCEDIMIENTO	7
11.1 INOCULACIÓN E INCUBACIÓN.....	7
11.2 CONTEO Y SELECCIÓN DE COLONIAS PARA CONFIRMACIÓN	7
11.3 SUBCULTIVO DE COLONIAS SELECCIONADAS	8

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

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE ENTEROBACTERIAS SEGÚN ISO 21528-2:2017	CÓDIGO	MI-GS-MA-107
		VERSIÓN	0
	LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PAGINA	Página 3 de 14

11.4 CONFIRMACION BIOQUIMICA	8
12.CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO	8
13.ANALISIS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS.....	8
14. EMISIÓN DEL INFORME DE RESULTADOS.....	12
15. EXÁMENES COMPLEMENTARIOS	12
16. NORMATIVIDAD APLICABLE.....	12
17. CONTROL DE CAMBIOS	13
18. ANEXO.....	13

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

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE ENTEROBACTERIAS SEGÚN ISO 21528-2:2017	CÓDIGO	MI-GS-MA-107
		VERSIÓN	0
	LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PAGINA	Página 4 de 14

1. OBJETIVO

Describir la metodología llevada a cabo por el laboratorio de microbiología de alimentos para determinar el recuento de Enterobacterias basados en la norma internacional ISO 21528-2:2017.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica a los alimentos de consumo humano contenidos en el anexo técnico de la Resolución 1407 de 2022, 1: Cremas de leche, 2: Helados de crema, 5: Frutos secos, 6: Caramelos, gomas, turrone.

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

AGAR VRBG Agar Bilis Glucosa con Cristal Violeta y Rojo neutro: Utilizado para la detección y recuento de Enterobacterias a partir de alimentos.

AGAR GLUCOSA OF Se utiliza para confirmar las colonias de Enterobacteriaceae en productos destinados al consumo humano. La digestión enzimática de caseína proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. Las colonias de presuntas enterobacterias deben confirmarse mediante pruebas para la fermentación de la glucosa y la presencia de oxidasa.

5. CONDICIONES GENERALES

Las enterobacterias corresponden a un grupo importante de microorganismos ubicados taxonómicamente dentro de las proteobacterias gamma y familia Enterobacteriaceae. Son coco-bacilos o bacilos, no producen esporas, móviles o inmóviles, capsuladas y no capsuladas, Gram negativos, metabólicamente aerobios o anaerobios facultativos, capaces de fermentar la glucosa con producción ácidos y/o gas, reducen los nitratos a nitritos y dan la reacción de oxidasa negativa.

Su hábitat está en el suelo, agua y vegetales, suelen formar parte del microbiota del intestino de animales domésticos, silvestres y humanos. Incluyen Salmonella y E. coli, conocidas por ser causantes de las enfermedades transmitidas por alimentos; las enterobacterias no patógenas se consideran organismos indicadores en la industria alimentaria, ya que su detección y enumeración pueden indicar un

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

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE ENTEROBACTERIAS SEGÚN ISO 21528-2:2017	CÓDIGO	MI-GS-MA-107
		VERSIÓN	0
	LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PAGINA	Página 5 de 14

procesamiento inadecuado y limpieza deficiente en la producción de alimentos.

6. FUNDAMENTO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se prepara una suspensión inicial de la muestra y diluciones a partir de la suspensión inicial, se transfiere la muestra a la caja de petri, se agrega una capa del medio VRBG. Posteriormente se incuban las placas a 37°C durante 24 horas.

Las enterobacterias fermentan glucosa y generan la acidificación del medio produciendo viraje del indicador del pH al color rojo intenso; por lo anterior, se observan colonias de color rojo púrpura de 1 a 2 mm.

Para realizar la confirmación, se subcultivan las presuntas colonias en un medio no selectivo y luego de la incubación se confirman mediante pruebas de fermentación de glucosa y presencia de oxidasa.

El número de enterobacterias por gramo o mililitro de muestra se calcula a partir del número de colonias típicas confirmadas por placa

7. LIMITACIONES O INTERFERENCIAS

- Toma y almacenamiento adecuado de la muestra
- Preparación y esterilización del material y medios de cultivo requeridos en el procedimiento.
- Generación de las condiciones semianaeróbicas

8. RECOLECCION E IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA

Ver MI-GS-MA-58 MANUAL DE LA UNIDAD DE VIGILANCIA DE RIESGO DEL AMBIENTE Y EL CONSUMO PARA TOMA, REMISIÓN, TRANSPORTE, ALMACENAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS Tabla 1. Método de recolección de muestras de alimentos y materias primas sólidas, líquidas, deshidratadas y descongeladas.

9. CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Es importante que el laboratorio reciba una muestra verdaderamente representativa y que no haya sido dañada o modificada durante el transporte y almacenamiento.

La muestra se conserva de acuerdo a la naturaleza del producto manteniendo las temperaturas de almacenamiento correspondientes. Ver MI-GS-MA-58 MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA TOMA, REMISIÓN, TRANSPORTE, ALMACENAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS, UNIDAD DE VIGILANCIA DE FACTORES DE RIESGO DEL AMBIENTE Y EL CONSUMO

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

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE ENTEROBACTERIAS SEGÚN ISO 21528-2:2017	CÓDIGO	MI-GS-MA-107
		VERSIÓN	0
	LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PAGINA	Página 6 de 14

SALUD PÚBLICA DE SANTANDER Cuadro 2. LABORATORIO DE ALIMENTOS: Obtención, envío y conservación de muestras para análisis Microbiológico de alimentos.

10. EQUIPOS, MATERIALES, REACTIVOS Y CONTROLES.

10.1 EQUIPOS Y MATERIALES

- Incubadora a 37°C
- Baño de agua o incubadora a 47- 50 °C
- Refrigerador a 4 +/- 2°C
- Contador de colonias
- Cajas de Petri estériles
- Tubos estériles tapa rosca
- Puntas estériles
- Micropipeta 100- 1000 uL.

10.2 REACTIVOS

- Agar selectivo VRBG (Glucosa Bilis Rojo Violeta)
- Agar Nutritivo
- Agar Glucosa OF
- Agua Peptona
- Aceite mineral estéril
- Tiras de oxidasa

10.3 CONTROLES

- *Escherichia coli* ATCC 25922 (Control positivo)
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Control negativo)

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

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE ENTEROBACTERIAS SEGÚN ISO 21528-2:2017	CÓDIGO	MI-GS-MA-107
		VERSIÓN	0
	LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PAGINA	Página 7 de 14

11. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

11.1 INOCULACIÓN E INCUBACIÓN

- Pesar 10 g de muestra, agregar 90 mL de agua peptonada 0.1% y homogenizar.
- 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. Repetir esta operación tantas veces como diluciones sean necesarias.
- Transferir 1 mL de cada una de las diluciones a su caja de Petri estériles respectiva por duplicado
- Añadir aproximadamente 15 mL de agar bilis rojo violeta glucosa (VRBG) previamente preparado a temperatura entre 47°C- 50°C. El tiempo entre la inoculación y el vertido del medio no debe exceder los 15 minutos.
- Mezclar el inóculo con el medio de cultivo mediante movimientos de la siguiente manera: mover la caja de arriba hacia abajo 5 veces, mover la caja cinco veces en el sentido de las agujas del reloj, mover la caja 5 veces haciendo ángulo recto sobre el movimiento y finalmente rotar la caja cinco veces en el sentido contrario de las agujas del reloj.
- Después de la solidificación agregar una capa de aproximadamente 5 ml de agar VRBG para evitar la propagación del crecimiento y lograr condiciones semianaeróbicas. Dejar solidificar.
- Incubar las cajas a 37°C invertidas durante 24 horas.

11.2 CONTEO Y SELECCIÓN DE COLONIAS PARA CONFIRMACIÓN

- Seleccionar las cajas que contengan menos de 150 colonias características y realizar el conteo.
- Elegir al azar cinco colonias para realizar las pruebas de confirmación bioquímica (si hay menos de cinco se toman todas las colonias presuntivas presentes en la caja). Si no hay colonias características elegir cinco colonias blanquecinas para confirmar.

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

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE ENTEROBACTERIAS SEGÚN ISO 21528-2:2017	CÓDIGO	MI-GS-MA-107
		VERSIÓN	0
	LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PAGINA	Página 8 de 14

11.3 SUBCULTIVO DE COLONIAS SELECCIONADAS

- Sembrar las colonias seleccionadas en agar nutritivo
- Incubar las placas invertidas a 37°C durante 24 horas
- Pasado el tiempo de incubación seleccione una colonia aislada para realizar la confirmación bioquímica

11.4 CONFIRMACION BIOQUIMICA

- Para la reacción de oxidasa, tomar una porción de la colonia aislada y extenderla sobre la tira que contiene el reactivo de oxidasa disponible comercialmente. Esperar 10 segundos para ver la reacción.
- Para la prueba de fermentación, tomar del agar nutritivo las colonias con resultado oxidasa negativo e inocular en los tubos que contienen agar glucosa OF y cubrir la superficie con 1 mL de aceite mineral estéril e incubar a 37°C por 24 h +/- 2 h; si no se cuenta con este medio de cultivo realizar la identificación de la colonia utilizando las tarjetas para identificación de gram negativos y el equipo vitek

12.CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

El control de calidad se realizará de acuerdo con MI-GS-GI-171 GUIA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD ANALITICA DEL ÁREA DE MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS

Verificar el crecimiento en el control positivo observando un crecimiento adecuado y colonias características de color rojo púrpura de 1 a 2 mm.

El control negativo no debe presentar crecimiento, registrar en el formato MI-GS-RG-118 CONTROL TÉCNICO MICROBIOLÓGICO.

La prueba de esterilidad de los medios utilizados, no debe presentar crecimiento luego de las 24 horas de incubación a 35 °C y a los 3 días de incubación a 25°C.

13. ANALISIS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Seleccionar las placas preferiblemente en dos diluciones sucesivas, en las que el recuento de Enterobacterias sea menor a 150 colonias, contar en cada placa las colonias.

Las colonias características de Enterobacterias son de color rosa a rojo purpura con o sin halo de precipitación. Nota: Ciertas colonias de Enterobacterias pueden crecer

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

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE ENTEROBACTERIAS SEGÚN ISO 21528-2:2017	CÓDIGO	MI-GS-MA-107
		VERSIÓN	0
	LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PAGINA	Página 9 de 14

blanquecinas o causar decoloración del medio (Imagen 1)

Imagen 1. Colonias típicas de Enterobacterias en agar VRBG



Realizar los cálculos teniendo en cuenta las colonias que se contaron en cada caja de las diluciones realizadas, utilizando la siguiente expresión:

Imagen 2. Ecuación para realizar el cálculo de ufc

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

donde:

$\sum C$: 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:

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

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE ENTEROBACTERIAS SEGÚN ISO 21528-2:2017	CÓDIGO	MI-GS-MA-107
		VERSIÓN	0
	LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PAGINA	Página 10 de 14

Imagen 3. Ejemplo de aplicación de la ecuación para el cálculo de ufc

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

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

El número se debe aproximar a la 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 solo se observa crecimiento en una dilución, se utiliza la siguiente fórmula, teniendo en cuenta lo anteriormente explicado:

Imagen 4. Ecuación y ejemplo cuando solo se observan colonias en la primera dilución

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


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	Aydé López Sánchez	Jenny Osma

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE ENTEROBACTERIAS SEGÚN ISO 21528-2:2017	CÓDIGO	MI-GS-MA-107
		VERSIÓN	0
	LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PAGINA	Página 11 de 14

Resultados de la confirmación bioquímica

Prueba de oxidasa

El resultado de la prueba de oxidasa es positivo cuando el papel filtro de la tira de la prueba se vuelve azul oscuro o violeta al transcurrir 10 segundos (Imagen 5).

El resultado de la prueba de oxidasa es negativo cuando el papel filtro de la tira de la prueba no se vuelve azul oscuro o violeta al transcurrir 10 segundos (imagen 5).

Imagen 5. Resultados de la prueba de oxidasa



Prueba de fermentación

Si se desarrolla un color amarillo en todo el contenido del tubo, se considera la reacción como positiva. La reacción es negativa si no hay cambio de color en el tubo (imagen 6).

Imagen 6. Prueba de fermentación de glucosa negativa (izquierda-verde) y positiva (derecha-amarilla).



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

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE ENTEROBACTERIAS SEGÚN ISO 21528-2:2017	CÓDIGO	MI-GS-MA-107
		VERSIÓN	0
	LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PAGINA	Página 12 de 14

Las colonias que son oxidasas negativas y glucosas positivas se confirman como Enterobacterias.

En el resultado se informa el número de Enterobacterias en UFC por gramo o mililitro de muestra. Esto se logra multiplicando el número de colonias encontradas en una caja, por el inverso de la dilución correspondiente a esa caja.

En el caso de no encontrar colonias características de Enterobacterias, el resultado a reportar es: menor de 10 UFC/g o mL según la matriz de la muestra.

Se informará el resultado del Análisis en la MI-GS-RG-157 HOJA DE DATOS PRIMARIOS ÁREA MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS

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

Las pruebas bioquímicas que se realizan para la identificación de Enterobacterias pueden montarse en el equipo VITEK®2 Compact utilizando las tarjetas GN para Gram-negativos.

16. NORMATIVIDAD APLICABLE

ISO 21528-2: 2017 Método horizontal para la detección y enumeración de Enterobacterias. Parte 2. Técnica de conteo de colonias

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

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE ENTEROBACTERIAS SEGÚN ISO 21528-2:2017	CÓDIGO	MI-GS-MA-107
		VERSIÓN	0
	LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PAGINA	Página 13 de 14


17. CONTROL DE CAMBIOS

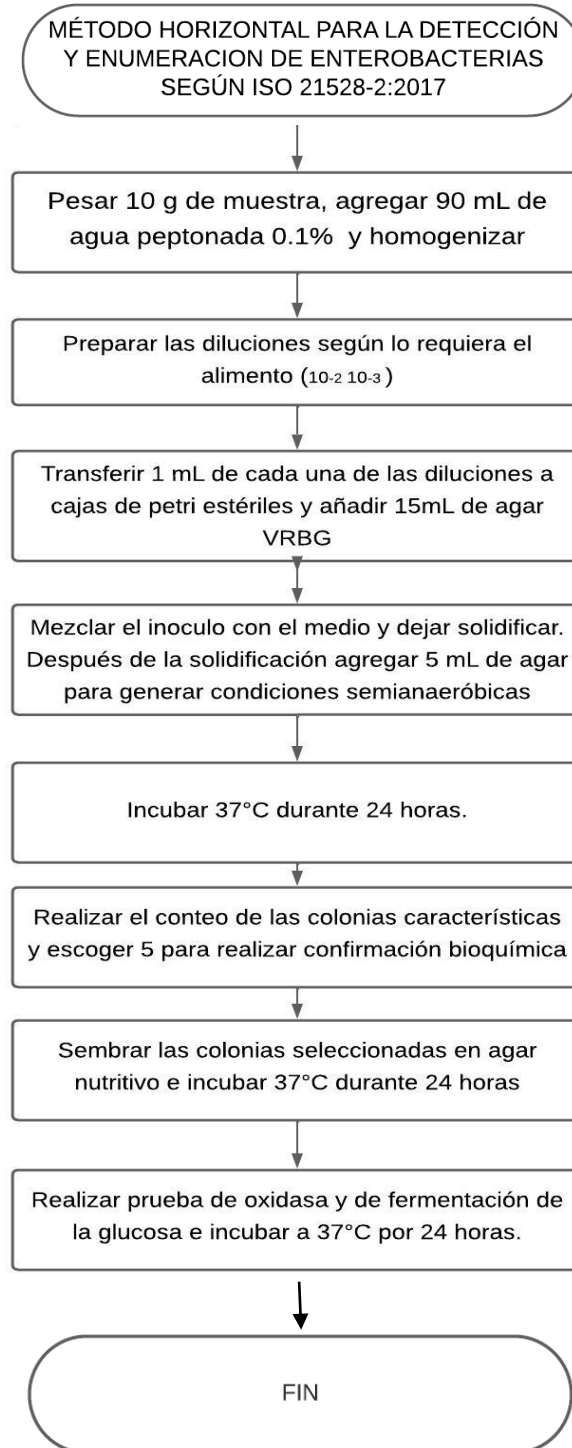
CONTROL DE CAMBIOS				
VERSIÓN	FECHA	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO	REVISÓ	APROBÓ
0		Emisión inicial del documento	Alba Rocío Orduz Amézquita Líder Grupo LDSP Zulema Rosalba Villarreal Directora de Salud Integral Samuel Santamaría Director de Planeación y Mejoramiento en Salud	Edwin Antonio Prada Ramírez Secretario de Salud de Santander

18. ANEXO

Flujograma método horizontal para la detección y enumeración de enterobacterias según ISO 21528-2:2017

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

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE ENTEROBACTERIAS SEGÚN ISO 21528-2:2017	CÓDIGO	MI-GS-MA-107
		VERSIÓN	0
	LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	FECHA DE APROBACIÓN	28/05/2024
		PAGINA	Página 14 de 14



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