



Resolución Directoral

Lima, 27 de Agosto de 2018

VISTO:



El Oficio N° 577-2018-DMGS-LRSP-LRSP N°189-DIRIS-LE/MINSA, de la Dirección de Monitoreo y Gestión Sanitaria y el Memorando N° 0209-2018-DA-DIRIS-LE/MINSA, de la Dirección Administrativa de la Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este; y,

CONSIDERANDO

Que, en el marco del Decreto Legislativo N° 1161, Ley de Organización y Funciones del Ministerio de Salud y su Reglamento aprobado mediante Decreto Supremo N° 008-2017-SA y su modificatoria se crean las Direcciones de Redes Integradas de Salud, incluyendo la Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este (DIRIS-LE), como órganos descentrados del Ministerio de Salud;

Que, habiendo concluido los respectivos procesos de transferencia, a tenor de lo dispuesto en la Resolución Ministerial N° 522-2017/MINSA la Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este asumió la responsabilidad de las funciones y competencias de la ex Dirección de Salud IV Lima Este (ex DISA-IV-LE) y la ex Dirección de Red de Salud Lima Este Metropolitana (ex DRS-LEM), dando continuidad a la prestación de servicios y procedimientos administrativos a cargo de éstas, de acuerdo al marco normativo vigente;

Que, mediante Oficio N° 577-2018-DMGS-LRSP-LRSP N°189-DIRIS-LE/MINSA, de la Dirección de Monitoreo y Gestión Sanitaria solicita se apruebe el Manual de Procedimientos Operativos Estandarizados del Laboratorio de Microbiología de Alimentos y otro, considerando que su aprobación es requisito indispensable para el proceso de categorización de establecimiento de apoyo al diagnóstico especializado, acreditación de ensayos de Laboratorio y supervisión del Instituto Nacional de Salud;

Que, el mencionado documento técnico tiene como finalidad, la estandarización de los procedimientos para los análisis de alimentos preparados y de superficies en contacto con alimentos y bebidas;

Que, a través del Informe N° 009-2018-M-OP-DA-DIRIS-LE/MINSA, la Oficina de Planeamiento y Modernización de la Gestión Pública señala que el referido Manual de Procedimientos Operativos Estandarizados, cumple con los aspectos técnicos con respecto a la estructura establecida por la normatividad vigente;

Que, el mencionado documento técnico ha cumplido con transitar por las etapas correspondientes para su elaboración conforme a lo dispuesto en la Norma para la Elaboración de Documentos Normativos del Ministerio de Salud, aprobado por Resolución Ministerial N° 850-2016/MINSA;

Que, con la finalidad de continuar con el desarrollo de las actividades y procesos técnicos sanitarios a nivel institucional, lo que permitirá alcanzar los objetivos y metas programadas en la DIRIS Lima Este, resulta pertinente atender a lo solicitado por la Dirección de Monitoreo y Gestión Sanitaria, en consecuencia corresponde emitir el acto resolutivo que permita aprobar el documento técnico: Manual de Procedimientos Operativos Estandarizados del Laboratorio de Microbiología de Alimentos, de acuerdo al marco normativo vigente;





Con las visaciones de la Dirección de Monitoreo y Gestión Sanitaria, la Dirección Administrativa y la Oficina de Asesoría Jurídica;

De conformidad con las disposiciones contenidas en la Ley N° 26842, Ley General de Salud, y sus modificatorias; y el Manual de Operaciones de las Direcciones de Redes Integradas de Salud, aprobado por Resolución Ministerial N° 467-2017/MINSA;

SE RESUELVE:

Artículo 1º.- Aprobar el Documento Técnico **"Manual de Procedimientos Operativos Estandarizados del Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este"**; que forma parte de la presente Resolución Directoral como anexo.

Artículo 2º.- Disponer la publicación de la presente Resolución Directoral, en el Portal de Transparencia de la Página Web de la Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este.

Registrese y comuníquese



Distribución:
() DG
() DMGS
() DA
() Archivo

MINISTERIO DE SALUD
DIRECCIÓN DE REDES INTEGRADAS
DE SALUD LIMA ESTE
M.C. Leoncio Barranzuela Sarango
DIRECTOR GENERAL



DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE
LABORATORIO REFERENCIAL DE SALUD PÚBLICA DIRIS
LIMA ESTE

LABORATORIO
DE SALUD
AMBIENTAL

MINISTERIO DE SALUD

DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE

LABORATORIO REFERENCIAL DE SALUD PUBLICA LIMA ESTE LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL



Dirección de Redes
Integradas de Salud
Lima Este

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS ESTANDARIZADOS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS

Lima, 2018





**MINISTERIO DE SALUD
DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD
LIMA ESTE**

**LABORATORIO REFERENCIAL DE SALUD PUBLICA
LIMA ESTE-LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL**

Dr. LEONCIO BARRANZUELA SARANGO
Director General de la DIRIS LIMA ESTE

Dra. VALENTINA ANTONIETA ALARCON GUIZADO
Directora Ejecutiva de la Dirección de Monitoreo y
Gestión Sanitaria

Lic. TM WILDER EDEN CHILCA RAMOS
Coordinador(e) del Laboratorio Referencial de Salud
Pública

Blga. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL
Resp. Laboratorio de Salud Ambiental

Lima, 2018





INDICE

	Pág.
INTRODUCCION	5
GENERALIDADES	6
I. FINALIDAD	6
II. OBJETIVOS	6
III. ALCANCE	6
IV. BASE LEGAL	6
V. DISPOSICIONES GENERALES	6
5.1 DEFINICIONES	6
5.2 SIGLAS Y ABREVIATURAS	8
VI. DISPOSICIONES ESPECIFICAS	9
6.1 TOMA DE MUESTRA	9
6.1.1 DE ALIMENTOS	9
6.1.2 DE SUPERFICIE	9
a) Método del hisopo	9
b) Método de la esponja	10
c) Método del enjuague	11
6.2 CONSERVACION Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA	12
6.3 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO	12
6.3.1 RECEPCIÓN	12
6.3.2 MANIPULACIÓN	13
6.3.3 HOMOGENIZADO	13
6.3.4 PESADO	13
6.3.5 DILUCIONES	13
6.3.6 INOCULACIÓN E INCUBACIÓN	14
6.4 CALCULO DE RESULTADOS	14
6.4.1 PARA SUPERFICIES	14
a) Método de Hisopo	14
b) Método de la Esponja	14
c) Método de Enjuague	15
6.4.2 PARA ALIMENTOS	15
VII. RESPONSABILIDADES	15
VIII. BIBLIOGRAFIA	15



 PERÚ Ministerio de Salud Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este	DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE LABORATORIO REFERENCIAL DE SALUD PÚBLICA DIRIS LIMA ESTE	LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL
---	--	---

IX. LISTA DE PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS ESTANDARIZADOS	16
POE 01: METODO HORIZONTAL PARA LA NUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS. TECNICA DE VERTIDO EN PLACA	17
POE 02: NUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS (Petrifilm™ Method)	22
POE 03: MÉTODO HORIZONTAL PARA LA NUMERACIÓN DE COLIFORMES. TECNICA DE RECUENTO EN PLACA	25
POE 04: RECUENTO DE COLIFORMES Y <i>Escherichia coli</i> EN ALIMENTOS. (Petrifilm™ Method)	28
POE 05: MÉTODO HORIZONTAL PARA LA ENUMERACIÓN DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS. TÉCNICA USANDO MEDIO BAIRD-PARKER.	32
POE 06: NUMERACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i> EN TIPOS SELECCIONADOS DE PROCESADOS Y ALIMENTOS PREPARADOS (Petrifilm™ Method)	39
POE 07: MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN DE <i>Salmonella spp.</i>	42
POE 08: NUMERACIÓN DE MOHOS Y LEVADURAS	46



INTRODUCCION

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) constituyen el problema de salud pública más extendido en el mundo actual.

Los alimentos contaminados con microbios pueden causar infecciones, intoxicaciones y toxiinfecciones. Para que se genere una infección, debe haber una ingestión de microbios que se multiplican en el hospedero y las intoxicaciones se generan por la ingestión de alguna toxina generada por un microorganismo dispuesto en un alimento. Las toxiinfecciones son una combinación de ambas, debido a que se necesita ingerir el microorganismo y que dentro del hospedero libere su toxina, para que se presente el cuadro de enfermedad.

En los alimentos el crecimiento de microorganismos está determinado por factores intrínsecos, vinculados con el alimento, y con factores extrínsecos, relacionados donde se guarda el alimento.

La presencia de microorganismos en los alimentos no significa necesariamente un peligro para el consumidor o una calidad inferior de estos productos. La mayor parte de los alimentos se convierten en potencialmente patógenos para el consumidor después que han sido violados los principios de higiene, limpieza y desinfección durante el proceso de elaboración, transporte y conservación. Si los alimentos han estado sometidos a condiciones que pudieran haber permitido la llegada a los mismos y/o la multiplicación de agentes infecciosos o toxigénicos; pueden constituir un vehículo de transmisión de enfermedades, tales como salmonelosis o la intoxicación estafilocócica.

Una deficiente calidad sanitaria de los alimentos se traduce en daños de variada naturaleza para las poblaciones implicadas.

Para realizar un análisis microbiológico de alimentos es necesario ejecutar la recolección de la muestra de manera que no haya contaminación en este proceso, para que el análisis tenga validez. Son de primordial importancia para obtener resultados significativos y confiables, la adecuada selección de la muestra, la toma correcta de ésta, los medios de conservación y su transporte al laboratorio. El examen microbiológico proporciona información en cuanto a la calidad del producto bruto y a las condiciones sanitarias en que ha sido elaborado, así como a la eficacia del medio de preservación.



 <p>PERÚ Ministerio de Salud Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este</p>	<p>DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE LABORATORIO REFERENCIAL DE SALUD PÚBLICA DIRIS LIMA ESTE</p>	<p>LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL</p>
---	---	--

GENERALIDADES

El presente manual de procedimientos operativos estandarizados de alimentos preparados y superficies en contacto con alimentos de la Dirección de Laboratorio de Salud Pública DIRIS **LE** es un instrumento descriptivo y de sistematización normativa para los ensayos analíticos del laboratorio de salud ambiental.

I. FINALIDAD

El presente manual tiene por finalidad la estandarización de los procedimientos para los análisis de alimentos preparados y de superficies en contacto con alimentos y bebidas.

II. OBJETIVOS

- Instruir e informar al personal que labora en el laboratorio de salud ambiental sobre los procedimientos a realizar para los análisis de alimentos preparados y de superficies.
- Uniformizar y controlar el cumplimiento de los procedimientos, evitando las alteraciones arbitrarias.
- Simplificar las actividades relacionadas con los procedimientos estandarizados.
- Fortalecer y aumentar la eficiencia y eficacia de los trabajadores en el laboratorio de salud ambiental.

III. AMBITO DE APLICACIÓN

El presente manual es de obligatorio cumplimiento por todo el personal del laboratorio de salud ambiental.

IV. BASE LEGAL

Ley N° 26842 Ley General De La Salud.

Ley N° 27657 Ley del Ministerio de Salud.

Resolución Ministerial 461-2007/MINSA "Guía Técnica para el Análisis Microbiológico de Superficies en contacto con Alimentos y Bebidas".

Resolución Ministerial 591-2008/MINSA "Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano".

V. DISPOSICIONES GENERALES

5.1 DEFINICIONES

Alimento:

Es toda sustancia elaborada, semielaborada o en bruto, que se destina al consumo humano, incluidas las bebidas, goma de mascar y cualesquiera otras sustancias que se



 <p>PERÚ Ministerio de Salud Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este</p>	<p>DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE LABORATORIO REFERENCIAL DE SALUD PÚBLICA DIRIS LIMA ESTE</p>	<p>LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL</p>
---	---	--

utilicen en la elaboración, preparación o tratamiento de "alimentos", pero no incluye los cosméticos, el tabaco ni las sustancias que se utilizan únicamente como medicamentos.

Muestra:

Parte o cantidad pequeña de una cosa que se considera representativa del total y que se toma o se separa de ella con ciertos métodos para someterla a estudio, análisis o experimentación.

Microorganismos:

Entidad de tamaño microscópico, que incluye bacterias, hongos, protozoos y virus.

Manipulador de alimentos:

Toda persona que por su actividad laboral tiene contacto directo con los alimentos durante su preparación, fabricación, transformación, elaboración, envasado, almacenamiento, transporte, distribución, venta, suministro y servicio.

Superficies vivas:

Son las partes externas del cuerpo humano que entran en contacto con el equipo, utensilios y alimentos durante su preparación y consumo.

Superficies inertes:

Son todas las partes externas y/o internas de los utensilios que están en contacto con los alimentos.

Aerobios mesófilos:

Todos los microorganismos, capaces de desarrollar en presencia de oxígeno a una temperatura óptima de 30°C.

Calidad sanitaria:

Es el conjunto de requisitos microbiológicos, físico-químicos y organolépticos que debe reunir un alimento para ser considerado apto para el consumo.

Análisis microbiológico:

Procedimiento que se sigue para determinar la presencia, identificación y cantidad de microorganismos patógenos.

Coliformes totales:

Grupo de especies bacterianas que tienen ciertas características bioquímicas en común e importancia relevante como indicadores de contaminación del agua y los alimentos. Las bacterias de este género se encuentran principalmente en el intestino de los humanos y de los animales de sangre caliente, pero también ampliamente distribuidas en la naturaleza, especialmente en suelos, semillas y vegetales. Son bacilos Gram negativos, no esporulados que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas a 35 ± 0.5 dentro de las 48 ± 3 horas.

Coliformes Termotolerantes (fecales):

Son bacterias que forman parte del total del grupo coliformes. Son definidas como bacilos Gram negativos, no esporulados que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas a $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ dentro de las 24 ± 2 horas. La mayor especie en el grupo de coliformes



 <p>PERU Ministerio de Salud Dirección de Redes Integradas de Salud LIMA ESTE</p>	<p>DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE LABORATORIO REFERENCIAL DE SALUD PÚBLICA DIRIS LIMA ESTE</p>	<p>LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL</p>
--	--	---

fecales es *Escherichia coli* y en menor grado las especies de *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*.

Microorganismos indicadores de alteración:

Microorganismos asociados con la vida útil y alteración del producto tales como microorganismos aerobios mesófilos, bacterias heterotróficas, aerobios mesófilos esporulados, mohos, levaduras, levaduras osmófilas, bacterias acido lácticas, microorganismos lipolíticos.

Microorganismos indicadores de higiene:

Microorganismos no patógenos que suelen estar asociados a ellos, como coliformes totales, *E. coli*, anaerobio sulfito reductores, *Enterobacteriaceas* (a excepción de preparaciones en polvo o fórmulas para lactante que se consideran en el grupo de microorganismos patógenos).

Microorganismos patógenos:

En este grupo se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, cuya cantidad en los alimentos condicionan su peligrosidad para causar enfermedades alimentarias. También encontramos microorganismos que su sola presencia en los alimentos condiciona su peligrosidad para la salud como *Salmonella sp*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio cholerae*, entre otros patógenos.

5.2 SIGLAS Y ABREVIATURAS

POE: Procedimiento Operativo Estandarizado

DIRIS: Dirección de redes integradas de salud

UFC: Unidades formadoras de colonia

MNPC: Muy numeroso para contar

VRBA: Agar bilis lactosa rojo neutro cristal violeta

BHI: Cerebro corazón infusión

RVS: Rappaport vassiliadis soya

MKTTn: Müller kauffmann tetratiónato mas novobiocina

XLD: Xilosa lisina desoxicícolato

AN: Agar nutritivo

TSI: Hierro triple azúcar

VP: Vogues Proskauer



 <p>PERÚ Ministerio de Salud Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este</p>	<p>DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE LABORATORIO REFERENCIAL DE SALUD PÚBLICA DIRIS LIMA ESTE</p>	<p>LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL</p>
--	--	---

VI. DISPOSICIONES ESPECIFICAS

6.1 TOMA DE MUESTRA

6.1.1 DE ALIMENTOS

La toma de muestras de los alimentos durante la recolección, elaboración, almacenamiento, transporte o venta, permite determinar si los alimentos y bebidas muestreados y analizados cumplen o no con la reglamentación sanitaria vigente, de igual manera aportan datos para las evaluaciones de riesgos entre otras; por lo cual los laboratorios son un componente esencial del sistema de inspección, vigilancia y control de los alimentos.

La toma de muestras debe coordinarse previamente con el laboratorio, para confirmar la capacidad de éste de realizar los análisis requeridos y planificar lo necesario para efectuar el análisis lo que incluye disponibilidad de materiales, reactivos, estándares y demás insumos necesarios y planificar previamente lo necesario del muestreo.

Se debe tener presente que la calidad de un análisis depende de la calidad del muestreo. Algunos aspectos básicos a tener en cuenta en el proceso de toma de muestras:

- Utilizar técnicas correctas para la toma de muestras que aseguren la integridad de la muestra.
- Durante la toma de muestra deben existir las mayores precauciones de asepsia.
- Llenar correctamente la documentación que acompaña la toma de la muestra.
- Transportar la muestra en forma adecuada para evitar que sufra cambios en sus características.
- La entrega oportuna en el laboratorio donde se va a realizar el análisis.

Estas operaciones pueden influir en la confiabilidad de los resultados si no se realizan correctamente.

Recolección de muestras de alimentos

- Se procura elegir para el muestreo, alimentos de mayor riesgo como son entradas y/o ensaladas, cebiches, refrescos, jugos, etc.
- Tomar la muestra elegida no menos de 100gr o 100ml; de manera aséptica en material de primer uso estéril, como bolsas o frascos.
- Para alimentos congelados tomar pequeños volúmenes congelados en el empaque original, sin descongelar ni abrir.
- Rotular y transportar al laboratorio.

6.1.2 DE SUPERFICIES

La recolección de las muestras se debe de efectuar evitando toda contaminación externa, tanto ambiental, como humana para asegurar la integridad de la misma. Utilizar recipientes limpios, secos, libres de fugas, de boca ancha, estériles y de un tamaño apropiado para la toma de las muestras del producto.

Identificar cada muestra unitaria.

Los métodos utilizados para la toma de muestra de estas superficies son las siguientes:

a) Método del Hisopo:

Se utiliza para superficies inertes regulares e irregulares, tales como tabla de picar, bandejas, mesas de trabajo, utensilios, cuchillas de equipos, cortadora de embutidos,



cortadora de pan de molde, fajas transportadoras, tolvas, mezcladoras, pisos, paredes y otros. Consiste en frotar con un hisopo estéril previamente humedecido en una solución diluyente, el área determinada en el muestreo.

Materiales:

- Hisopos de algodón u otro material equivalente, de largo aproximado de 12 cm.
- Tubo de ensayo con tapa hermética conteniendo 10 mL de solución diluyente estéril.
- Plantilla estéril, con un área abierta en el centro de 100 cm² (10cm x 10cm) o alternativamente, plantilla estéril, con un área abierta en el centro de 25 cm² (5 cm x 5 cm).
- Guantes descartables de primer uso.
- Protector de cabello.
- Mascarillas descartables.
- Plumón marcador indeleble (para vidrio).
- Caja térmica.
- Refrigerantes.

Procedimiento:

- Colocar la plantilla (10cm x 10cm) sobre la superficie a muestrear.
- Humedecer el hisopo en la solución diluyente y presionar ligeramente en la pared del tubo con un movimiento de rotación para quitar el exceso de solución.
- Con el hisopo inclinado en un ángulo de 30°, frotar 4 veces la superficie delimitada por la plantilla, cada una en dirección opuesta a la anterior. Asegurar el hisopado en toda la superficie.
- En el caso de utilizar la plantilla de 5cm x 5cm, repetir esta operación 3 veces más, en lugares diferentes de la misma superficie, para obtener 100 cm².
- Colocar el hisopo en el tubo con la solución diluyente, quebrando la parte del hisopo que estuvo en contacto con los dedos del muestreador, la cual debe ser eliminada.
- Para superficies irregulares, en el caso de utensilios, se repetirá la operación con 3 utensilios más (total 4 como máximo), con el mismo hisopo, considerando el área que está en contacto con el alimento o con la boca.
- Si no se toman las 4 muestras, se debe anotar en la Ficha de Toma de Muestra.

b) Método de la Esponja:

Se utiliza preferentemente para muestrear superficies de mayor área y consiste en frotar con una esponja estéril, previamente humedecida en una solución diluyente, el área determinada en el muestreo.

Materiales:

- Esponja estéril de poliuretano o de celulosa, de 5cm x 5 cm.
- Plantilla estéril, con un área en el centro de 100 cm² (10 cm x 10 cm).
- Frascos con tapa rosca de 250 mL de capacidad, con 100 mL de solución diluyente estéril.
- Pinzas estériles.
- Bolsas de polietileno de primer uso.
- Guantes descartables de primer uso.



- Protector de cabello.
- Mascarillas descartables.
- Plumón marcador indeleble (para vidrio).
- Caja térmica.
- Refrigerantes.

Procedimiento:

- Retirar la esponja de su envoltura con la pinza estéril o con guantes descartables o bien usar una bolsa de primer uso, invertida a manera de guante.
- Humedecer la esponja con la solución diluyente estéril (aproximadamente 10 mL).
- En condiciones asepticas frotar vigorosamente el área a muestrear. En el caso de superficies regulares, frotar el área delimitada por la plantilla y en las superficies irregulares (cuchillas, equipos, utensilios, entre otros), frotar abarcando la mayor cantidad de superficie.
- Colocar la esponja en el frasco con el resto de la solución diluyente o alternativamente colocar la esponja con la muestra en una bolsa de plástico de primer uso.
- Para el caso específico de utensilios se debe repetir la operación con 3 utensilios más (total 4 como máximo), con la misma esponja, considerando el área que está en contacto con el alimento o con la boca.
- Las tazas, copas o vasos se muestrean 2 a 3 cm alrededor del borde por dentro y por fuera.

c) Método del Enjuague:

Se utiliza para superficies vivas (manos) y para objetos pequeños o para el muestreo de superficies interiores de envases, botellas, bolsas de plástico, etc. El método consiste en realizar un enjuague (botellas, frascos, utensilios, similares) o inmersión (manos, objetos pequeños) en una solución diluyente.

Materiales:

- Frascos con tapa hermética de boca ancha de 250 mL de capacidad, con 100 mL de solución diluyente estéril.
- Bolsas de polietileno de primer uso.
- Pinzas estériles.
- Guantes descartables de primer uso.
- Protector de cabello.
- Mascarillas descartables.
- Plumón marcador indeleble (para vidrio).
- Caja térmica.
- Refrigerantes.

Procedimiento:

Para manos

- Vaciar el diluyente del frasco (100 mL) en una bolsa plástica de primer uso.
- Introducir las manos a muestrear hasta la altura de la muñeca.
- Solicitar al manipulador que realice un frotado de los dedos y particularmente alrededor de las uñas y la palma de la mano, adicionalmente el muestreador



deberá realizar la misma operación a través de las paredes de la bolsa, durante un minuto aproximadamente.

- Luego de retirar las manos se regresa el líquido al frasco o se anuda la bolsa y ésta se coloca en otra bolsa para que esté segura; en este caso, la bolsa que se utilice debe ser estéril.

Para recipientes (frascos, jarras, otros)

- Vaciar en el recipiente a muestrear una parte de la solución estéril (frasco con 100mL) y agitar vigorosamente.
- Regresar la solución a su frasco original.
- Cerrar herméticamente el frasco para su traslado.

Para objetos pequeños (piezas de equipos, otros)

- Se introduce individualmente cada objeto en el frasco o bolsa con la solución estéril y agitar vigorosamente.
- Luego con una pinza estéril, retirar el objeto pequeño del frasco o bolsa.
- Si se muestrea más de un objeto pequeño de igual naturaleza, se debe considerar esto en el cálculo de resultados a fin de evitar reportes inexactos.

6.2 CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

- Transportar los alimentos refrigerados o congelados en contenedores seguros y apropiados de construcción rígida, de tal manera que puedan llegar al laboratorio sin cambio alguno.
- Las muestras de alimentos deberán entregarse al laboratorio, en el menor tiempo posible.
- Las muestras se colocarán en un contenedor isotérmico con gel refrigerante, el cual se distribuirá uniformemente en la base y en los laterales, para asegurar que la temperatura del contenedor no sea mayor de 10°C, a fin de asegurar la vida útil de la muestra hasta su llegada al laboratorio. El tiempo de transporte entre la toma de muestra y la recepción en el laboratorio estará en función estricta de dicha temperatura, no debiendo exceder las 24 horas y excepcionalmente las 36 horas.
- Las condiciones de conservación, transporte, tiempo comprendido entre la recolección de la muestra, su entrega en el laboratorio, así como la realización del análisis influyen notoriamente en los resultados obtenidos, ya que la población microbiana puede sufrir cambios cualitativos y cuantitativos, esto es apreciablemente cierto en los productos perecederos.

6.3 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO

6.3.1 RECEPCION

Tan pronto como la muestra llega al laboratorio, anotar las condiciones físicas generales de la misma. Examinar los contenedores de muestras con el objetivo de localizar posibles defectos físicos graves. Inspeccionar cuidadosamente bolsas y botellas para comprobar que no presentan hoyos, fracturas, etc., además corroborar que no exista contaminación cruzada proveniente de los defectos descritos anteriormente y que invalidaría el análisis. Asignar a cada muestra unitaria un número individual y analizarla separadamente a menos de que se trate de una muestra compuesta. Si es posible, examinar las muestras



inmediatamente después de recibirlas, si la muestra no puede ser analizada inmediatamente, deberá ser almacenada a -20°C hasta su realización. Refrigerar las muestras perecederas no congeladas de 0-4°C por un periodo máximo de 36 horas. Los alimentos no perecederos, enlatados o de baja humedad se almacenarán a temperatura ambiente hasta el análisis.

6.3.2 MANIPULACION

Antes de manipular o analizar las muestras, limpiar las áreas de trabajo y áreas circundantes con un agente germicida comercial.

Utilizar una técnica aséptica para el manejo del producto congelado. De preferencia no descongelar las muestras antes del análisis. Si es necesario atemperar la muestra congelada para tomar una porción analítica, descongelar en el empaque original o en el contenedor en el que se recibió en el laboratorio. Cuando sea posible, evitar la transferencia de la muestra a un segundo contenedor para descongelar. Normalmente la muestra puede ser descongelada de 2 a 5°C en 18 horas. Si se desea un descongelado rápido, someter la muestra a una temperatura menor a 45°C por un tiempo no mayor a 15 min. Cuando se descongele una muestra a temperatura elevada (mayor a 45°C), agitar la muestra continuamente en un baño de agua con termostato.

6.3.3 HOMOGENIZACION

Las muestras líquidas se pueden homogenizar manualmente moviendo de forma circular, y las muestras secas con una cuchara estéril u otro utensilio antes de tomar la muestra analítica.

Si el contenido del empaque es obviamente no homogéneo (por ejemplo, una comida congelada), examinar la muestra analítica del alimento macerado, o preferiblemente analizar cada porción por separado, dependiendo del objetivo del análisis. El homogenizado se puede realizar mecánicamente con una licuadora, en stomacher, en vortex o manualmente.

6.3.4 PESADO

Para el pesado, tarar el vaso de licuadora o la bolsa de stomacher; entonces pesar el tamaño de muestra analítica recomendado (si es congelado, pesar antes de descongelar).

6.3.5 DILUCIONES

El diluyente debe estar a una temperatura que se aproxime a la temperatura ambiente, para evitar daños de los microorganismos por cambios bruscos.

El volumen de diluyente para realizar las diluciones debe ser 9 veces el volumen o peso de la muestra.

Las soluciones diluyentes pueden ser: solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 7.2, agua peptonada al 0.1%, agua peptona bufferada o solución salina peptonada, según se indica en cada método.

Para realizar las diluciones pesar como mínimo 10 g ó 10 ml de muestra, adicionar una cantidad de diluyente necesario para obtener una dilución 1/10 (10^{-1}) y homogenizar entre 1 a 3 minutos dependiendo del alimento. Realizar rápidamente diluciones decimales, para lo cual transferir con una pipeta 1 ml de la suspensión inicial en un tubo con 9 ml del diluyente estéril. No usar pipetas con una capacidad mayor a 10 mL para medir volúmenes menores a 1 mL; para medir volúmenes de 0.1 mL, no utilizar pipetas con una capacidad mayor a 1 mL.



Para una óptima precisión no introducir la pipeta más de 1 cm en la suspensión inicial y evitar el contacto entre la pipeta que contiene el inóculo y el diluyente estéril.

Mezclar utilizando preferentemente un agitador mecánico durante 5 a 10 segundos para obtener la dilución 10^{-2} . Si es necesario, repetir esta operación a partir de la dilución 10^{-2} y diluciones sucesivas, utilizando en cada operación una nueva pipeta estéril para obtener las siguientes diluciones (10^{-3} , 10^{-4} , etc.). Se hacen las diluciones que sean necesarias para obtener un número apropiado de microorganismos para realizar el recuento. Agitar cada dilución enérgicamente unas 25 veces para asegurar la correcta homogenización.

El tiempo transcurrido entre el final de la preparación de la suspensión inicial y el instante en que el inóculo entra en contacto con el medio de cultivo no debe superar los 45 minutos, mientras que el lapso de tiempo límite entre la preparación de la suspensión inicial y el comienzo de la preparación de las diluciones decimales sucesivas es de 30 minutos.

En algunos casos, particularmente para los productos muy viscosos o muy espesos, podría ser necesario agregar mayor cantidad de diluyente lo cual debe tenerse en cuenta en las operaciones subsiguientes y/o en la expresión de resultados.

6.3.6 INOCULACIÓN E INCUBACIÓN

Proceder a realizar las siembras correspondientes las cuales se especifican en cada método.

De la misma forma el tiempo y la temperatura de incubación se encuentra establecida en cada método.

6.4 CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

6.4.1 PARA SUPERFICIES

a) Método del hisopo:

Para superficies regulares:
$$\frac{(\text{Nºcolonias})(\text{factor de dilución})(\text{V sol. Diluyente})}{\text{Area Muestreada}}$$

Para superficies irregulares:
$$(\text{Nºcolonias})(\text{factor de dilución})(\text{V sol. Diluyente})$$

Los resultados se expresarán:

- Para superficies regulares en: ufc / cm^2
- Para superficies irregulares en: $\text{ufc} / \text{superficie muestreada}$ (ej. cuchilla de licuadora, cuchara, etc.). Se deberá expresar la cantidad de superficies muestreadas. (ej. $\text{ufc} / 4$ cucharas).

b) Método de la esponja:

Para superficies regulares:
$$\frac{(\text{Nºcolonias})(\text{factor de dilución})(\text{V sol. Diluyente})}{\text{Area Muestreada}}$$

Para superficies irregulares:
$$\frac{(\text{Nºcolonias})(\text{factor de dilución})(\text{V sol. Diluyente})}{4 \text{ Superficies muestreadas}}$$

Los resultados se expresarán:

- Para superficies regulares en: ufc / cm²
- Para superficies irregulares en: ufc/ superficie muestreada (ej. cuchilla de licuadora, cuchara, etc.).

c) **Método del enjuague:**

Para superficies vivas: (Nºcolonias)(factor de dilución)(V sol. Diluyente)

Para superficies interiores u objetos: (Nºcolonias)(factor de dilución)
(V sol. Diluyente)

4 Superficies muestreadas

Los resultados se expresarán:

- Para superficies regulares en: ufc / manos:
- Para superficies internas en: ufc/ superficie muestreada (ej. envases, bolsas de plástico, etc.).

6.4.2 PARA ALIMENTOS

Para el caso de Alimentos, los cálculos se especifican en cada método descrito en su respectivo Procedimiento Operativo Estandarizado (POE).

VII. RESPONSABILIDADES

- La Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este es la responsable del cumplimiento de las disposiciones contenidas en el presente manual.
- La Dirección de Monitoreo y Gestión Sanitaria a través de la Oficina de Laboratorio de Salud Pública es la responsable de brindar la asistencia técnica, la implementación, supervisión, así mismo garantizar la provisión de insumos, equipos y operatividad de las instalaciones para la adecuada aplicación de las disposiciones contenidas en el presente manual.
- El Laboratorio de Salud Ambiental es el responsable del cumplimiento de los procedimientos contemplados en el presente manual.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Guía Técnica para el Análisis de Microbiológico de Superficies en Contacto con Alimentos y Bebidas. Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA).
- Guía de Interpretación de Resultados Microbiológicos de Alimentos. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). Instituto Nacional de Alimentos (INAL).
- International Standard. ISO 6887-1. Microbiología de la cadena alimentaria. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales



para examen microbiológico. Parte 1: Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales. 2017.

IX. LISTA DE PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS ESTANDARIZADOS

- Método horizontal para la numeración de microorganismos aerobios mesófilos. Técnica de vertido en placa.
- Numeración de microorganismos aerobios mesófilos. (Petrifilm™ Method).
- Método horizontal para la numeración de coliformes. Técnica de recuento en placa.
- Recuento de coliformes y *Escherichia coli* en alimentos. (Petrifilm™ Method).
- Método horizontal para la enumeración de estafilococos coagulasa positivos. Técnica usando medio Baird-Parker.
- Numeración de *Staphylococcus aureus* en tipos seleccionados de procesados y alimentos preparados. (Petrifilm™ Method).
- Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.
- Numeración de mohos y levaduras.



TITULO: NUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS. TECNICA DE VERTIDO EN PLACA

POE N° : 01	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 1 de 5

I. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología para realizar el recuento de microorganismos capaces de crecer y formar colonias en un medio sólido tras la incubación a 30°C.

II. ALCANCE

Laboratorio de salud ambiental.

III. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Agua peptona bufferada o Solución salina peptonada
- Agar Plate Count
- Estufa de esterilización
- Autoclave
- Estufa de incubación: 30°C ± 1°C
- Baño de agua o equipo similar capaz de mantener la temperatura entre 44°C y 47°C
- Equipo contador de colonias modelo Quebec de campo oscuro o equivalente
- Peachímetro de exactitud 0.1 a 25°C ± 1°C
- Equipo para mezclado (tipo stomacher)
- Agitador mecánico (tipo vortex)
- Vasos o recipientes de vidrio de capacidad adecuada (para homogenizar la muestra), resistente a esterilización en autoclave.
- Placas de Petri de vidrio o plástico de 90 a 100 mm de diámetro
- Pipetas de 10, 5 y 1 ml de capacidad, graduadas con divisiones de 0.1 ml, o pipetas automáticas con tips estériles.
- Tubos de ensayo, frascos o botellas, de capacidad no mayor a 500 ml.
- Balanza de 2,000g de capacidad y una sensibilidad de 0,1g.

IV. PROCEDIMIENTO:

- Preparar la suspensión inicial y diluciones decimales sucesivas como se indica en el punto 6.3.5 del presente manual.
- Transferir por medio de una pipeta estéril 1 ml de la primera dilución en dos (2) placas de Petri estériles. Si se preparan placas de varias diluciones, se puede reducir a una placa por dilución.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Blga. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL	31/04/2018





TITULO: NUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS. TECNICA DE VERTIDO EN PLACA

POE N° : 01	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 2 de 5

- Se coloca entre 12 ml a 15 ml del agar Plate Count enfriado a 44°C - 47°C en cada placa de Petri, evitando verter directamente el medio sobre el inóculo (el tiempo transcurrido entre que se terminó de preparar la dilución inicial y el momento en que se agrega el agar a las placas no debe exceder los 45 min), se mezcla cuidadosamente el inóculo con el medio de cultivo por rotación suave de la placa de Petri. Se colocan las tapas y se deja solidificar sobre una superficie horizontal fría, a temperatura ambiente. Después de la completa solidificación del medio y solo en los casos en que se sospeche que la muestra contiene microorganismos cuyas colonias invaden la superficie del medio, verter 4 ml del agar para cubrir a 44°C - 47°C sobre la superficie del medio inoculado. Dejar solidificar. Invertir las placas e incubar en la estufa a 30°C ±1°C por 72 h ± 3 h.
- Después de la incubación por el periodo especificado, seleccionar las placas que, de ser posible, tengan menos de 300 colonias. Contar las colonias, si es necesario 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 precipitados 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 de 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 sobrecrecimiento en un área superior a un cuarto de la placa, se rechaza este recuento.
- Preferiblemente el resultado se expresa como un número entre 1.0 y 9.9 multiplicado por la potencia de 10 adecuada, o como un número entero con dos cifras significativas.
- El resultado se expresa como número de microorganismos por mililitro (para productos líquidos) o por gramo (para el resto de productos).

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Blga. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL	31/04/2018





TITULO: NUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS. TECNICA DE VERTIDO EN PLACA

POE N° : 01	Revisión N° - 01	Fecha de Aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 3 de 5

V. CALCULO Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

• **Caso General**

El número de microorganismos N presentes en la muestra para análisis se calcula como la media corregida de dos diluciones consecutivas, utilizando la ecuación:

$$N = \frac{\Sigma C}{V \times 1,1 \times d}$$

Donde:

ΣC : es la suma de las colonias contadas en dos placas de las dos diluciones consecutivas, de las cuales al menos una contiene un mínimo de 10 colonias.

V : es el volumen de inóculo utilizado en cada placa, en mililitros.

d : es la dilución correspondiente a la primera dilución elegida ($d = 1$ cuando se utiliza el producto líquido sin diluir).

El resultado calculado se redondea a dos cifras significativas, subir el segundo dígito al siguiente número más alto cuando el tercer dígito de la izquierda sea 5, 6, 7, 8 o 9; si la tercera cifra es inferior a 5, no se modifica la cifra anterior.

Ejemplo 1: El recuento ha proporcionado los siguientes resultados:

Para la primera dilución escogida (10^{-2}): 168 colonias;

Para la segunda dilución (10^{-3}): 14 colonias.

$$N = \frac{\Sigma C}{V \times 1,1 \times d} \quad N = \frac{168 + 14}{1 \times 1,1 \times 10^{-2}} \quad N = \frac{182}{0,011} = 16545$$

Redondeando el resultado como se indicó, el número de microorganismos es de 17.000 o 1.7×10^4 por mililitro o por gramo de producto.

NOTA: en caso de sembrar 0.1 ml, $V = 0.1$ ml

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Blga. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL	31/04/2018



TITULO: NUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS. TECNICA DE VERTIDO EN PLACA

POE Nº : 01	Revisión Nº - 01	Fecha de aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 4 de 5

• Caso en el que una placa contiene menos de 10 colonias

Si la placa contiene menos de 10 colonias, pero como mínimo 4, el resultado se calcula siguiendo el caso general y se expresa como: "el número estimado de microorganismos x por mililitro o por gramo".

Si el resultado total oscila entre 1 y 3, la precisión del análisis es demasiado baja y el resultado debe expresarse como: "hay microorganismos presentes, pero a un nivel inferior a (4xd) por gramo o ml".

Ejemplo: Si la dilución inoculada es 10^{-1} :

Hay microorganismos presentes, pero a un nivel inferior a 40 UFC/g ó ml

• Caso en el que la placa no contiene colonias

Si la placa que contiene la muestra para análisis (productos líquidos) o la suspensión inicial (resto de productos), o la primera dilución inoculada o escogida no contiene colonias, el resultado se expresa de la siguiente manera:

"Menos de 1/d microorganismos por mililitro o por gramo".

Donde d es el factor de dilución ($d = 1$ cuando se inocula directamente la muestra para análisis).

Ejemplo:

Si la dilución más concentrada sembrada fue: 10^{-1}

< 10 UFC /ml o g

Si la dilución más concentrada sembrada fue: 10^{-2}

< 100 UFC /ml o g

• Caso en el que la placa contiene más de 300 colonias

Si el recuento de colonias en todas las placas de todas las diluciones es incontable, mayor a 300, el resultado se expresa como: "Más de 300/d microorganismos /g ó ml", donde d es la dilución correspondiente a la última dilución escogida.

Ejemplo:

Si la última dilución (más diluida) sembrada fue: 10^{-3}

> 300.000 microorganismos / ml o g; ó $> 3 \times 10^5$ UFC/ml o g

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Blga. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL	31/04/2018





TITULO: NUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS. TECNICA DE VERTIDO EN PLACA

POE N° : 01	Revisión N° - 01	Fecha de Aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 5 de 5

REFERENCIAS:

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

REDACCION:

BLGA. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL

APROBACION:

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	07 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES:

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	



TITULO: NUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS. (Petrifilm™ Method)

POE Nº : 02	Revisión Nº - 01	Fecha de Aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 1 de 3

I. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología para realizar el recuento de microorganismos capaces de crecer y formar colonias en placas Petrifilm 3M tras la incubación a 30°C.

II. ALCANCE

Laboratorio de salud ambiental.

III. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Como diluyentes usar tampón fosfato, agua de peptona, tampón de Butterfield, solución Ringer, peptona-sal, agua destilada y otros.
- Placa Petrifilm 3M Aerobic Count Plate
- Estufa de esterilización
- Autoclave
- Estufa de incubación: 30°C ± 1°C
- Peachímetro de exactitud 0.1 a 25°C ± 1°C
- Equipo para mezclado (tipo stomacher)
- Agitador mecánico (tipo vortex)
- Vasos o recipientes de vidrio de capacidad adecuada (para homogenizar la muestra), resistente a esterilización en autoclave.
- Pipetas de 1 ml de capacidad, graduadas con divisiones de 0.1 ml, o pipetas automáticas con tips estériles.
- Pipetas de 5 y 10 ml
- Tubos de ensayo, frascos o botellas, de capacidad no mayor a 500 ml.
- Balanza de 2,000g de capacidad y una sensibilidad de 0,1g.

IV. PROCEDIMIENTO:

- Preparar una dilución de la muestra de alimento 1:10 o superior como se indica en el punto 6.3.5 del presente manual.
- Mezclar u homogeneizar la muestra mediante los métodos usuales.
- Disponer la placa Petrifilm en una superficie plana.
- Levantar el film superior y pipetear 1 ml de muestra al centro aproximadamente del film inferior. Mantener la pipeta en posición vertical. No tocar el film inferior mientras se pipetea.
- Soltar el film superior y dejarlo caer. No deslizar el film hacia abajo.
- Colocar el aplicador en el film superior bien centrado sobre el inóculo. Usar el aplicador con la cara rebajada hacia abajo (cara lisa hacia arriba).

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
<i>Blga. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL</i> LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL	<i>31/04/2018</i>





TITULO: NUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS. (Petrifilm™ Method)

POE Nº : 02	Revisión Nº - 01	Fecha de Aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 2 de 3

- Aplicar presión de manera suave sobre el aplicador para distribuir el inóculo por toda la zona circular. No mover ni girar el aplicador.
- Levantar el aplicador. Esperar 1 minuto para que se solidifique el gel.
- Incubar las placas Petrifilm cara arriba y apiladas en grupos de no más de 20 placas. Incubar a 30 +/-1°C durante 72 +/-2 horas para cualquier tipo de alimento.
- Usar un lector de placas 3M Petrifilm, contador de colonias estándar Quebec u otros. No usar luz de fondo para la lectura de esta placa, usar luz directa.

V. INTERPRETACION DE RESULTADOS:

Aerobic Count Plate (APC) 3M Petrifilm contiene nutrientes y cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio como indicador de crecimiento bacteriano. La reducción de trifeniltetrazolio por bacterias da como resultado colonias de color rojo. Las placas se hidratan con muestras y los agentes gelificantes hacen que los medios se solidifiquen.

• Recuento de colonias

Contar todas las colonias rojas independientemente de su tamaño y de la intensidad de color. Usar un contador estándar tipo Quebec o un lector de placas 3M Petrifilm para leer la placa Petrifilm. Para muestras de hisopos los recuentos deben expresarse en UFC / cm².

Multiplicar el resultado por el factor de dilución y redondear a dos cifras significativas.

• Recuento estimado

Cuando el número de colonias es superior a 300, se puede realizar una estimación. Contar las colonias de una cuadrícula (1 cm²) y multiplicar por 20 para obtener el recuento total por placa. El área de inóculo de una placa Petrifilm de Aerobios es de 20 cm² aproximadamente.

• Muy Numeroso Para Contar (MNPC)

Con recuentos muy altos, toda el área de crecimiento puede virar al rosa. Alguna colonia individual podría observarse en el borde del área de crecimiento. Registrar este resultado como muy numeroso para contar (MNPC).

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Blga. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL	31/04/2018





TITULO: NUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS. (Petrifilm™ Method)

POE N° : 02	Revisión N° - 01	Fecha de Aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 3 de 3

REFERENCIAS:

- Guía de Interpretación Aerobic Plate Count in Foods (Petrifilm™ Method).

REDACCION:

BLGA. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL

APROBACION:

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	07 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES:

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	



TITULO: MÉTODO HORIZONTAL PARA LA NUMERACIÓN DE COLIFORMES. TÉCNICA DE RECUENTO EN PLACA

POE N° : 03	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 1 de 3

I. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología para realizar el recuento de microorganismos coliformes de productos destinados al consumo humano y de superficies.

II. ALCANCE

Laboratorio de salud ambiental.

III. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Agua peptona al 0,1% como diluyente
- Agar Bilis Lactosa Rojo Neutro Cristal Violeta (VRBA)
- Caldo verde brillante de bilis lactosa
- Estufa de esterilización
- Autoclave
- Estufa de incubación: 35 a 37°C
- Baño de agua o equipo similar para mantener la temperatura entre 44°C y 47°C
- Equipo contador de colonias (opcional)
- Peachímetro de exactitud 0.1 a 25°C ± 1°C
- Equipo para mezclado (tipo stomacher)
- Agitador mecánico (tipo vortex)
- Vasos o recipientes de vidrio de capacidad adecuada (para homogenizar la muestra), resistente a esterilización en autoclave.
- Placas de Petri de vidrio o plástico de 100 a 15 mm de diámetro
- Pipetas de 10, 5 y 1 ml de capacidad, graduadas con divisiones de 0.1 ml, o pipetas automáticas con tips estériles.
- Tubos de ensayo con campanas de Durhan.
- Frascos o botellas, de capacidad no mayor a 500 ml.
- Balanza de 2,000g de capacidad y una sensibilidad de 0,1g.

IV. PROCEDIMIENTO:

- Preparar la suspensión inicial y diluciones decimales sucesivas como se indica en el punto 6.3.5 del presente manual.
- Transferir por medio de una pipeta estéril 1 ml de la muestra líquida, o 1 ml de la dilución 10⁻¹ en el caso de otros productos en dos placas de Petri estériles. Si se preparan placas de más diluciones, se puede reducir a una placa por dilución.
- Tomar otra placa de Petri estéril y transferir 1 ml de la dilución 10⁻¹ (productos líquidos) o 1 ml de la dilución 10⁻² (otros productos).

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Blga. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL	31/04/2018



TITULO: MÉTODO HORIZONTAL PARA LA NUMERACIÓN DE COLIFORMES. TÉCNICA DE RECUENTO EN PLACA

POE N° : 03	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 2 de 3

- Tomar otra placa de Petri estéril y transferir 1 ml de la dilución 10^{-1} (productos líquidos) o 1 ml de la dilución 10^{-2} (otros productos). Si es necesario, se repite el procedimiento con mayores diluciones.
- Añadir entre 10 ml a 15 ml del VRBA enfriado a 44°C - 47°C en cada placa de Petri, evitando verter directamente el medio sobre el inóculo. Mezclar cuidadosamente el inóculo con el medio de cultivo por rotación suave de la placa de Petri. Se colocan las tapas y se deja solidificar sobre una superficie horizontal fría, a temperatura ambiente.
- El tiempo transcurrido entre que se terminó de preparar la dilución y el momento en que se agrega el agar a las placas no debe exceder los 45 min.
- Despues de la completa solidificación del medio, verter 3,4 ml del agar para cubrir a 44°C - 47°C sobre la superficie del medio de tal modo que se forme una capa que cubra la superficie del medio, evitando así que se formen colonias superficiales.
- Dejar solidificar. Invertir las placas e incubar en la estufa a 35-37°C por 24h±2 h.

V. RECUENTO Y SELECCIÓN DE LAS COLONIAS

- Despues de la incubación por el periodo especificado, seleccionar las placas que, de ser posible, tengan entre 10 y 150 colonias.
- Contar las colonias típicas: rojo oscuro o moradas, en ocasiones rodeadas de un halo rojizo de precipitación, de tamaño superior a 0,5mm de diámetro. Estas colonias no requieren identificación posterior.

VI. CONFIRMACIÓN

- Inocular 5 colonias atípicas de cada tipo en tubos de Caldo verde brillante de bilis lactosa
- Incubar a 37°C durante 24 h ± 2 h
- Considerar como coliformes aquellas que produzcan gas en la campana Durham.

VII. CALCULO Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Para calcular el número de coliformes por mililitro (para productos líquidos) o por gramo (para el resto de productos), se multiplica el número de colonias promedio de dos placas de la misma dilución por la dilución correspondiente. El resultado calculado se redondea a dos cifras significativas.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Biga, SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL	31/04/2018





TITULO: MÉTODO HORIZONTAL PARA LA NUMERACIÓN DE COLIFORMES. TÉCNICA DE RECUENTO EN PLACA

POE N° : 03	Revisión N° - 01	Fecha de Aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 3 de 3

REFERENCIAS:

- ISO 4832. 2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coliforms - colony counts technique.

REDACCION:

BLGA. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL

APROBACION:

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	07 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES:

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	



 <p>PERÚ Ministerio de Salud Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este</p>	<p>DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE LABORATORIO REFERENCIAL DE SALUD PÚBLICA DIRIS LIMA ESTE</p>	<p>LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL</p>
---	---	--

<p>TITULO: RECUENTO DE COLIFORMES Y <i>Escherichia coli</i> EN ALIMENTOS (Petrifilm™ Method)</p>		
POE Nº : 04	Revisión Nº - 01	Fecha de Aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 1 de 4

I. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología para realizar el recuento de coliformes y *E. coli* en muestras de alimentos destinados al consumo humano y de superficies.

II. ALCANCE

Laboratorio de salud ambiental.

III. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Como diluyentes usar tampón Butterfield (tampón IDF fosfato, 0.0425 g/L de KH_2PO_4 y con pH ajustado a 7.2); agua de peptona al 0.1%; diluyente de sal peptonada (método ISO 6887); buffer de agua peptonada (método ISO 6579); solución salina (0.85 a 0.90%); caldo Lethen libre de bisulfato o agua destilada.
- Placa Petrifilm 3M *E.coli*/Coliform Count Plate
- Estufa de esterilización
- Autoclave
- Estufa de incubación: 35°C a 37°C \pm 1°C
- Peachímetro de exactitud 0.1 a 25°C \pm 1°C
- Equipo para mezclado (tipo stomacher)
- Agitador mecánico (tipo vortex)
- Vasos o recipientes de vidrio de capacidad adecuada (para homogenizar la muestra), resistente a esterilización en autoclave.
- Pipetas de 1 ml de capacidad, graduadas con divisiones de 0.1 ml, o pipetas automáticas con tips estériles.
- Pipetas de 5 y 10 ml
- Frascos o botellas, de capacidad no mayor a 500 ml.
- Balanza de 2,000g de capacidad y una sensibilidad de 0,1g.

IV. PROCEDIMIENTO:

- Preparar la suspensión inicial y diluciones decimales sucesivas como se indica en el punto 6.3.5 del presente manual.
- Mezclar u homogenizar la muestra mediante los métodos usuales.
- Para un óptimo crecimiento y recuperación de los microorganismos ajuste el pH de la muestra diluida.
- Colocar la Placa Petrifilm en una superficie plana y nivelada. Levantar la película superior.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
<i>Blga. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL</i> LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL	31/04/2018





TITULO: RECUENTO DE COLIFORMES Y *Escherichia coli* EN ALIMENTOS (Petrifilm™ Method)

POE N° : 04	Revisión N° - 01 Fecha de Revisión: 06-04-2018	Fecha de Aplicación: 23-04-2018 Página: 2 de 4
-------------	---	---

- En forma perpendicular a la Placa Petrifilm, colocar 1 mL de la dilución de la muestra en el centro de la película cuadriculada inferior, con la Pipeta.
- Bajar con cuidado la película superior para evitar que atrape burbujas de aire. No dejarla caer.
- Con el lado liso hacia abajo, colocar el dispersor en la película superior sobre el inóculo.
- Presionar suavemente el dispersor para distribuir el inóculo sobre el área circular, antes de que solidifique el gel. No girar ni deslizar el dispersor.
- Levantar el dispersor. Esperar, por lo menos un minuto, a que solidifique el gel.
- Incubar con la cara arriba en grupos de no más de 20 piezas. Puede ser necesario humectar el ambiente de la incubadora con un pequeño recipiente de agua estéril, para minimizar la pérdida de humedad.
- Para coliformes incubar $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ a $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.
- Para *E. coli* incubar $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ a $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$

V. INTERPRETACION DE RESULTADOS:

Las Placas Petrifilm para el Recuento de *E.coli*/Coliformes contienen nutrientes de Bilis Rojo Violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de actividad de la glucuronidasa y un indicador que facilita la enumeración de las colonias. La mayoría de las *E. coli* (cerca del 97%) produce beta-glucuronidasa, la que a su vez produce una precipitación azul asociada con la colonia. La película superior atrapa el gas producido por *E. coli* y coliformes fermentadores de lactosa. Cerca del 95% de las *E. coli* producen gas, representado por colonias entre azules y rojo-azules asociadas con el gas atrapado en la Placa Petrifilm EC (dentro del diámetro aproximado de una colonia).

• Recuento de colonias:

El rango de recuento de la población en las Placas Petrifilm EC es de 15 a 150. No contar las colonias que aparecen sobre la barrera de espuma, ya que han sido removidas de la influencia del medio selectivo. Mientras el recuento de *E. coli* o coliformes aumenta, el color del gel se vuelve rojo oscuro o púrpura azulado. Cualquier azul en una colonia (de azul a rojo-azul) indica la presencia de *E. coli*. La luz de frente mejorará la detección del precipitado azul formado por una colonia.

Contar el total de colonias que producen gas como coliformes totales, y las colonias azules con gas como *E. coli*; multiplicar por el factor de dilución y redondear a dos cifras significativas.

Nombre de Responsable Bla. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL	Fecha de término de registro 31/04/2018
--	--





TITULO: RECUENTO DE COLIFORMES Y *Escherichia coli* EN ALIMENTOS (Petrifilm™ Method)

POE Nº : 04	Revisión Nº - 01	Fecha de Aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 3 de 4

• **Recuento estimado**

El área de crecimiento circular es de cerca de 20 cm². Los estimados pueden hacerse en placas que tienen más de 150 colonias, como resultado de contar las colonias en uno o más cuadrados representativos y de determinar el promedio por cuadrado. Multiplicar el número promedio por 20 para determinar el recuento estimado por placa.

Para un recuento más preciso, se recomienda una dilución adicional de la muestra.

• **Muy Numeroso Para Contar (MNPC)**

Las Placas Petrifilm EC con colonias Muy Numerosas Para Contar (MNPC) tienen una o más de las siguientes características: muchas colonias pequeñas, muchas burbujas de gas y un oscurecimiento del color del gel; en estos casos registrar este resultado como muy numeroso para contar (MNPC).

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Blga. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL	31/04/2018





TITULO: RECUENTO DE COLIFORMES Y *Escherichia coli* EN ALIMENTOS (Petrifilm™ Method)

POE Nº : 04	Revisión Nº - 01	Fecha de Aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 4 de 4

REFERENCIAS:

- Guía de Interpretación para el Recuento de E. coli /Coliformes (PetrifilmTM Method).

REDACCION:

BLGA. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL

APROBACION:

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	07 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES:

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	





TITULO: MÉTODO HORIZONTAL PARA LA ENUMERACIÓN DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS. TÉCNICA USANDO MEDIO BAIRD-PARKER.

POE Nº : 05	Revisión Nº - 01	Fecha de aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 1 de 7

I. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología para realizar el recuento y la confirmación de estafilococos coagulasa positiva (*Staphylococcus aureus* y otras especies) en muestras de alimentos destinados al consumo humano y de superficies.

II. ALCANCE

Laboratorio de salud ambiental.

III. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Agua peptona bufferada
- Solución salina peptonada
- Agar Baird Parker
- Emulsión de yema de huevo con telurito de potasio
- Caldo cerebro, corazón, infusión (caldo BHI)
- Plasma de conejo
- Estufa de esterilización
- Autoclave
- Estufa de incubación: 35°C a 37°C ± 1°C
- Baño de agua o aparato similar capaz de mantener la temperatura a 47°C ± 2°C.
- Peachímetro de exactitud 0.01 a 25°C ± 1°C.
- Pipetas de 1 ml, 2 ml y 10 ml de capacidad, graduadas en intervalos de 0.1, 0.1 y 0.5 ml respectivamente.
- Tubos de ensayo, botellas o frascos de capacidad apropiada,
- Placas de Petri de vidrio o plástico de 90 a 100 mm de diámetro y de 140 mm de diámetro.
- Espátula de Drigalsky.
- Balanza de 2000g de capacidad y sensibilidad de 0,1g.
- Contador de colonias de campo oscuro, Quebec o equivalente con fuente de luz apropiada.

IV. PROCEDIMIENTO:

- Preparar la suspensión inicial y diluciones decimales sucesivas como se indica en el punto 6.3.5 del presente manual.
- Transferir por medio de una pipeta estéril 0,1 ml de la muestra si el producto es líquido, ó 0,1 ml de la dilución 10⁻¹ en el caso de otros productos, y 0,1 ml de las diluciones sucesivas preparadas por duplicado a placas con agar Baird Parker.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Blga. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL	31/04/2018





TITULO: MÉTODO HORIZONTAL PARA LA ENUMERACIÓN DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS. TÉCNICA USANDO MEDIO BAIRD-PARKER.

POE Nº : 05	Revisión Nº - 01	Fecha de aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 2 de 7

- Si para ciertos productos es necesario realizar un recuento de un número bajo de estafilococos coagulasa positiva, el límite de detección puede ser elevado por un factor de 10 sembrando 1 ml de la muestra si el producto es líquido ó 1 ml de la suspensión inicial (dilución 10⁻¹) en caso de otros productos, y 1 ml de las diluciones sucesivas preparadas en una placa de Petri grande (140 mm) con agar Baird Parker o en tres placas de Petri de 90 mm con agar Baird Parker. En ambos casos, sembrar por duplicado utilizando 2 placas grandes ó 6 placas de Petri de 90 mm.
- Cuidadosamente extender el inóculo sobre la superficie del agar con una espátula de Drigalsky lo más rápido posible, tratando de no tocar los bordes de la placa. Dejar secar las placas sin invertir, con la tapa puesta durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Invertir las placas sembradas e incubar a 35°C - 37°C durante 24 h ± 2 h y luego 24 h ± 2 h adicionales.
- Despues de la incubación de 24 h ± 2 h marcar en el fondo de la placa la posición de cualquier colonia típica presente. (Ver NOTA 1)
- Incubar todas las placas a 35°C ó 37°C durante 24 h ± 2 h adicionales y marcar todas las colonias típicas nuevas. También marcar las colonias atípicas presentes. (Ver NOTA 2).
- Tener en cuenta para el recuento sólo las placas que contienen como máximo 300 colonias totales con 150 colonias típicas y/o atípicas hasta dos diluciones sucesivas. Una de las placas debe contener al menos 15 colonias.
- Seleccionar para la confirmación un número A de colonias (en general 5 colonias típicas si sólo hay colonias típicas o 5 colonias atípicas si sólo hay colonias atípicas o 5 colonias típicas y 5 colonias atípicas si se encuentran presente ambos tipos en cada placa).
- Si en la placa hay menos de 15 colonias típicas y/o atípicas inoculadas con el producto líquido sin diluir o con la más baja dilución de los otros productos. Es posible realizar un recuento estimado.
- Si se realizó un inóculo de 1 ml en tres placas considerar esas placas como una en los siguientes procedimientos de recuento y confirmación.
- Para realizar un recuento estimativo de un bajo número de estafilococos coagulasa positiva retener todas las placas que contienen colonias típicas y atípicas, seleccionar todas las colonias para la confirmación dentro de los límites establecidos arriba.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Blga. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL	31/04/2018





TITULO: MÉTODO HORIZONTAL PARA LA ENUMERACIÓN DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS. TÉCNICA USANDO MEDIO BAIRD-PARKER.

POE Nº : 05	Revisión Nº - 01	Fecha de aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 3 de 7

NOTA 1: Las colonias típicas son negras o grises, con brillo y convexas (de 1 mm a 1.5 mm de diámetro después de una incubación de 24 h y de 1.5 mm a 2.5 mm de diámetro después de una incubación de 48 h) y rodeadas por una zona de clarificación que puede ser parcialmente opaca. Después de una incubación de por lo menos 24 h puede aparecer un anillo opalescente de precipitación inmediatamente alrededor de la colonia.

NOTA 2: Las colonias atípicas son formadas principalmente por cepas de estafilococos coagulasa positiva presentes por ejemplo en productos lácteos, camarones y menudencias. Con menos frecuencia son formadas por cepas de estafilococos coagulasa positiva presentes en otros productos.

Las colonias atípicas son del mismo tamaño que las típicas y pueden presentar una de las siguientes morfologías:

- Colonias negras con brillo, con o sin un fino borde blanco, la zona de clarificación está ausente o es vagamente visible y el anillo opalescente ausente o poco visible.
- Colonias grises sin zona de clarificación.

NOTA 3: Algunas bacterias pertenecientes a otros géneros pueden dar colonias de apariencia similar a las de estafilococos, pero realizando una observación microscópica con coloración de Gram antes de la confirmación se puede realizar una separación de géneros.

NOTA 4: Las colonias restantes que pueden estar presentes en la placa y que no presentan apariencia de colonias típicas o atípicas son consideradas como flora acompañante.

V. CONFIRMACIÓN: PRUEBA DE LA COAGULASA

- De la superficie de cada colonia seleccionada remover un inóculo con ansa aguja y transferir a un tubo con caldo infusión cerebro corazón (caldo BHI), incubar a 35°C ó 37°C durante 24h ± 2h.
- Asépticamente agregar 0.1 ml de cada cultivo en 0.3 ml de plasma de conejo (a menos que otra cantidad sea especificada por el fabricante) en un tubo de hemólisis estéril. Incubar a 35°C ó 37°C.
- Inclinando el tubo observar la formación de coágulo después de 4 h a 6 h de incubación. Si la prueba es negativa reexaminar después de 24 h de incubación o examinar en el tiempo de incubación especificado por el fabricante.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Blga. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL	31/04/2018





TITULO: MÉTODO HORIZONTAL PARA LA ENUMERACIÓN DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS. TÉCNICA USANDO MEDIO BAIRD-PARKER.

POE Nº : 05	Revisión Nº - 01	Fecha de aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 4 de 7

- Considerar un resultado positivo si el volumen del coágulo formado ocupa más de la mitad del volumen del líquido original.
- Como control negativo para cada lote de plasma agregar 0.1ml de caldo BHI estéril a 0.3 ml de plasma de conejo e incubar sin inoculación. Para que la prueba sea válida el control negativo no debe mostrar signos de coagulación.

VI. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

- **Cálculo del número *a* de estafilococos coagulasa positiva identificados por cada placa seleccionada:**

Calcular para cada una de las placas seleccionadas el número *a* de estafilococos coagulasa positiva identificados de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$a = \frac{bc}{Ac} \times Cc + \frac{bnc}{Anc} \times Cnc$$

Donde:

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

Anc: es el número de colonias atípicas sometidas a la prueba de la coagulasa

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

bnc: es el número de colonias atípicas que dieron positiva la prueba de la coagulasa

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

Cnc: es el número de total de colonias atípicas que se contaron en la placa

Redondear a un número entero

- **Cálculo del número *N* de estafilococos coagulasa positiva identificados presentes en la porción de muestra sembrada:**

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

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

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Blga. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL	31/04/2018



TITULO: MÉTODO HORIZONTAL PARA LA ENUMERACIÓN DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS. TÉCNICA USANDO MEDIO BAIRD-PARKER.

POE Nº : 05	Revisión Nº - 01	Fecha de aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 5 de 7

Donde:

Σa : es el número de colonias de estafilococos 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)

Redondear el resultado calculado a 2 cifras significativas.

Informar el resultado como el número de estafilococos coagulasa positiva por mililitro (productos líquidos) o por gramo (otros productos), expresado como un número entre 1.0 y 9.9 multiplicado por 10^x donde x es la potencia apropiada de 10.

Ejemplo:

El recuento después de la inoculación con 0.1 ml del producto dio los siguientes resultados:

Para la primera dilución seleccionada (10⁻²): 65 colonias típicas y 85 colonias típicas, no hay colonias atípicas.

Para la segunda dilución seleccionada (10⁻³): 3 colonias típicas y 7 colonias típicas, no hay colonias atípicas.

Se obtuvieron los siguientes datos:

De las 65 colonias 5 colonias fueron sometidas a la prueba de la coagulasa y todas dieron un resultado positivo, obteniendo entonces un valor de $a = 65$

De las 85 colonias 5 colonias fueron sometidas a la prueba de la coagulasa y 3 colonias dieron un resultado positivo, obteniendo entonces un valor de $a = 51$

De las 3 colonias todas fueron sometidas a la prueba de la coagulasa y 3 colonias dieron un resultado positivo, obteniendo entonces un valor de $a = 3$

De las 7 colonias 5 colonias fueron sometidas a la prueba de la coagulasa y todas dieron un resultado positivo, obteniendo entonces un valor de $a = 7$

$$N = \frac{65 + 51 + 3 + 7}{0.1(2 + 0.1 \times 2)10^{-2}} = 57272$$

El resultado después de redondear se expresa como: 5.7×10^4

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Blga. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL	31/04/2018



TITULO: MÉTODO HORIZONTAL PARA LA ENUMERACIÓN DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS. TÉCNICA USANDO MEDIO BAIRD-PARKER.

POE Nº : 05	Revisión Nº - 01	Fecha de aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 6 de 7

- Estimación para un recuento bajo.**

Si en dos placas correspondientes a la muestra (productos líquidos) o a la suspensión inicial (otros productos), cada una tiene menos de 15 colonias identificadas, informar el resultado de la siguiente manera:

Para productos líquidos: estimación del número de estafilococos coagulasa positiva por mililitro:

$$N = \frac{\Sigma a}{V \times 2}$$

Donde:

Σa : es la sumatoria de las colonias de estafilococos coagulasa positiva identificadas
 V : es el volumen sembrado en cada placa

Para otros productos: estimación del número de estafilococos coagulasa positiva por gramo:

$$N = \frac{\Sigma a}{V \times 2 \times d}$$

Donde:

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

V : es el volumen sembrado en cada placa

d : es el factor de dilución de la suspensión

- Si no hay colonias en las placas.**

Si las dos placas correspondientes a la siembra de la muestra (producto líquido) o de la suspensión inicial (otros productos) no contienen colonias de estafilococos coagulasa positiva y si la inoculación ha sido realizada con 0.1 ml de muestra, se informa como menos de 10/d estafilococos coagulasa positiva por mililitro (para productos líquidos) o menos de 10/d estafilococos coagulasa positiva por gramo (resto de productos). Si la inoculación ha sido realizada con 1 ml de muestra informar el resultado como menos de 1/d estafilococos coagulasa positiva por mililitro (para productos líquidos) o menos de 1/d estafilococos coagulasa positiva por gramo (resto de productos).

Donde d es el factor de dilución.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Blga. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL	31/04/2018





TITULO: MÉTODO HORIZONTAL PARA LA ENUMERACIÓN DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS. TÉCNICA USANDO MEDIO BAIRD-PARKER.

POE Nº : 05	Revisión Nº - 01	Fecha de Aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 7 de 7

REFERENCIAS:

- ISO 6888-1: Primera edición 1999 / Amd 1. 2003. Método Horizontal para la Enumeración de Estafilococos Coagulasa Positivos (*Staphylococcus aureus* y otras especies). Parte 1: Técnica usando medio Baird-Parker.
- Guía Técnica para el Análisis de Microbiológico de Superficies en Contacto con Alimentos y Bebidas. Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA).

REDACCION:

BLGA. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL

APROBACION:

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	07 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES:

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	





TITULO: NUMERACIÓN DE *Staphylococcus aureus* EN TIPOS SELECCIONADOS DE PROCESADOS Y ALIMENTOS PREPARADOS (Petrifilm™ Method)

POE Nº : 06	Revisión Nº - 01	Fecha de aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 1 de 3

I. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología para realizar el recuento de *Staphylococcus aureus* en muestras de alimentos destinados al consumo humano y de superficies.

II. ALCANCE

Laboratorio de salud ambiental.

III. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Como diluyentes usar tampón Butterfield (tampón IDF fosfato, 0.0425 g/L de KH₂PO₄ y con pH ajustado a 7.2); agua de peptona al 0.1%; diluyente de sal peptonada (método ISO 6887); buffer de agua peptonada (método ISO 6579); solución salina (0.85 a 0.90%); caldo Lethen libre de bisulfato o agua destilada.
- Placas Petrifilm™ Staph Express
- Estufa de esterilización
- Autoclave
- Estufa de incubación: 35°C a 37°C ± 1°C
- Equipo para mezclado (tipo stomacher)
- Agitador mecánico (tipo vortex)
- Vasos o recipientes de capacidad adecuada (para homogenizar la muestra), resistente a esterilización en autoclave.
- Pipetas de 10, 5 y 1 ml de capacidad, graduadas con divisiones de 0.1 ml, o pipetas automáticas con tips estériles.
- Tubos de ensayo, frascos o botellas, de capacidad no mayor a 500 ml.
- Balanza de 2,000g de capacidad y una sensibilidad de 0,1g.

IV. PROCEDIMIENTO:

- Preparar la suspensión inicial y diluciones decimales sucesivas como se indica en el punto 6.3.5 del presente manual.
- Mezclar u homogenizar la muestra mediante los métodos usuales.
- Para un óptimo crecimiento y recuperación de los microorganismos ajuste el pH de la muestra diluida.
- Coloque la Placa Petrifilm en una superficie plana y nivelada. Levante la película superior. Con la Pipeta Electrónica 3M o una pipeta equivalente perpendicular a la Placa Petrifilm, coloque 1 mL de la muestra en el centro de la Placa.
- Deslice cuidadosamente la película superior hacia abajo para evitar atrapar burbujas de aire. No deje caer la película superior.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Biga. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL	31/04/2018



TITULO: NUMERACIÓN DE *Staphylococcus aureus* EN TIPOS SELECCIONADOS DE PROCESADOS Y ALIMENTOS PREPARADOS (Petrifilm™ Method)

POE Nº : 06	Revisión Nº - 01	Fecha de aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 2 de 3

- Aplique suavemente presión con el esparcidor para distribuir el inóculo sobre el área circular antes de que se forme el gel. Levante el esparcidor sin doblarlo o deslizarlo. Espere por lo menos un minuto para que se solidifique el gel.
- Incubar las Placas 24 ± 2 horas cara arriba en grupos de no más de 20 piezas. Puede ser necesario humectar el ambiente de la incubadora con un pequeño recipiente con agua estéril, para minimizar la pérdida de humedad.

V. CALCULO Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

- Las Placas Petrifilm Staph Express para Recuento de *Staphylococcus aureus* son un medio de cultivo listo para ser empleado, que contiene un agente gelificante soluble en agua fría. El medio modificado cromogénico Baird-Parker en la placa es selectivo y diferencial para el *Staphylococcus aureus* y las colonias aparecen rojo-violeta.
- El *S. aureus* produce desoxirribonucleasa (DNase); y la DNase reacciona con el indicador para formar zonas rosadas.
- El límite de recuento recomendado de una Placa Petrifilm Staph Express es de 150 colonias. Cuando el número de colonias de *S. aureus* excede de 150, las colonias se tornan Muy Numerosas Para Contar (MNPC), hacer un estimado del recuento o diluir aún más la muestra. Para hacer la estimación, contar las colonias en un cuadro representativo y multiplicar ese número por 30.
- Las Placas Petrifilm pueden ser contadas en un contador de colonias estándar u otro tipo de lupa con luz.
- Si no hay colonias presentes después de 24 ± 2 horas de incubación, el recuento es de cero y la prueba se considera terminada.
- Si sólo hay colonias rojo-violeta, la prueba está terminada. Contar todas las colonias rojo-violeta como *S. aureus*.
- Si además de colonias rojo-violeta aparecen colonias de otro color, insertar el Disco Staph Express Petrifilm, para lo cual se debe remover el disco de su empaque individual tomándolo de la pestaña, levantar la película superior de la Placa Petrifilm y colocar el Disco en la cavidad de la Placa.
- Bajar la película superior y aplicar presión gentilmente al área del Disco, incluyendo sus bordes, deslizando un dedo firmemente a lo largo de la película superior. Esto garantizará un contacto uniforme del Disco con el gel y eliminará cualquier burbuja de aire.
- Incubar las Placas con los Discos insertados cara arriba, en grupos de no más de 20 piezas, por 1 a 3 horas a 35 °C ± 1 °C ó 37 °C ± 1°C.
- Contar las zonas rosas como *S. aureus*.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Biga. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL	31/04/2018





TITULO: NUMERACIÓN DE *Staphylococcus aureus* EN TIPOS SELECCIONADOS DE PROCESADOS Y ALIMENTOS PREPARADOS (Petrifilm™ Method)

POE Nº : 06	Revisión Nº - 01	Fecha de Aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 3 de 3

REFERENCIAS:

- Guía de Interpretación Placas Petrifilm™ Staph Express para Recuento de *Staphylococcus aureus*.

REDACCION:

BLGA. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL

APROBACION:

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	07 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES:

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	



TITULO: MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN DE *Salmonella spp.*

POE Nº : 07	Revisión Nº - 01	Fecha de aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 1 de 4

I. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar la detección, aislamiento e identificación de *Salmonella spp* en muestras de alimentos destinados al consumo humano y de superficies.

II. ALCANCE

Laboratorio de salud ambiental.

III. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Agua peptona tamponada
- Caldo Rappaport – Vassiliadis con soja (caldo RVS)
- Caldo Müller – Kauffmann tetratrationato + novobiocina (MKTn)
- Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)
- Segundo medio sólido selectivo: a elección del laboratorio (Agar Verde Brillante Rojo de Fenol)
- Agar nutritivo (AN)
- Agar hierro triple azúcar (TSI)
- Agar urea
- Caldo lisina decarboxilasa
- Reactivos para la reacción de Voges-Proskauer (VP)
- Reactivos para la reacción de Indol
- Solución salina fisiológica
- Estufa de incubación a 37°C ± 1°C
- Baño de agua o estufa de incubación a 41.5°C ± 1°C
- Ansa de platino o níquel de aprox. 3 mm de diámetro o 10 µl.
- Pipetas graduadas o automáticas de 10 ml y 1 ml graduadas
- Tubos o frascos de capacidad apropiada.
- Placa de Petri de vidrio o plástico de 90 a 100 mm de diámetro y de 140mm de diámetro.

IV. PROCEDIMIENTO:

1. Preenriquecimiento

Pesar 25g de muestra y preparar la suspensión inicial usando como diluyente Agua peptona tamponada para llevar a una dilución 1/10.

Incubar a 37°C ± 1°C durante 18 h ± 2 h.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Bliga. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL	31/04/2018



TITULO: MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN DE *Salmonella* spp.

POE Nº : 07	Revisión Nº - 01 Fecha de Revisión: 06-04-2018	Fecha de aplicación: 23-04-2018 Página: 2 de 4
-------------	---	---

NOTA: Preparación de muestras compuestas (pool): Cuando se necesita analizar más de una porción de 25 g de un lote específico o un alimento y cuando existe evidencia disponible que la formación de pools no afecta los resultados de una muestra en particular, se pueden analizar muestras compuestas. Por ejemplo, en caso de analizar 10 muestras de 25 g, combinar las 10 muestras para formar una muestra de 250 g y agregar 2,25 l del caldo de preenriquecimiento. Alternativamente 0.1ml (en 10 ml de caldo RVS) y 1 ml (en 10 ml de MKTTn) del caldo de preenriquecimiento provenientes de 10 muestras separadas pueden ser combinadas para un enriquecimiento en 100 ml del caldo para enriquecimiento selectivo.

2. Enriquecimiento selectivo

- Transferir 0.1 ml del cultivo obtenido en el preenriquecimiento a un tubo con 10 ml de caldo RVS e incubar a 41.5 C° ± 1°C durante 24 h ± 3 h.
- Transferir 1 ml del cultivo obtenido en preenriquecimiento a un tubo con 10 ml de caldo MKTTn e incubar 37°C ± 1°C durante 24 h ± 3 h.

3. Aislamiento e identificación

- Tomar un ansada de los cultivos obtenidos en enriquecimiento selectivo (caldo RVS y MKTTn) y estriar en una placa de agar XLD. Proceder de la misma manera con el segundo agar selectivo.
- Incubar las placas de XLD a 37°C ± 1°C durante 24 h ± 3 h y el segundo agar selectivo de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
- Examinar las placas después de la incubación para la determinación de la presencia de colonias típicas de *Salmonella* y colonias atípicas que podrían ser *Salmonella*.
- Las colonias típicas de *Salmonella* en el agar XLD son transparentes, del mismo color del medio con centro negro.

4. Confirmación bioquímica

- Para la confirmación tomar de cada placa de Petri de cada medio selectivo al menos una colonia típica o sospechosa de *Salmonella* y 4 colonias más si la primera es negativa.
- Estriar por agotamiento en superficie en placas de agar nutritivo para obtención de colonias aisladas.
- Incubar las placas a 37°C ± 1°C durante 24 h ± 3 h.
- También se pueden utilizar kits comerciales para los cuales deben seguirse las instrucciones del fabricante.

Nombre de Responsable Bla. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL	Fecha de término de registro 31/04/2018
--	--



TITULO: MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN DE *Salmonella spp.*

POE Nº : 07	Revisión Nº - 01	Fecha de aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 3 de 4

Agar TSI: Con una aguja de inoculación hacer una punción en el fondo y estriar el pico de flauta. Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 h ± 3 h.

Las cepas típicas de *Salmonella* dan reacción alcalina (color rojo) en el pico de flauta y ácida (color amarillo) en el fondo, con formación de gas y (en aproximadamente en el 90% de los casos) formación de H₂S (ennegrecimiento del agar).

En presencia de una *Salmonella* lactosa positiva el pico de flauta del TSI es de color amarillo. Por esto la confirmación preliminar de *Salmonella* no debe basarse solamente en los resultados del TSI.

Agar urea: Con una aguja de inoculación estriar el pico de flauta. Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 h ± 3 h y examinar en intervalos.

Reacción positiva: por hidrólisis de la urea se libera amonio que vira el color del indicador rojo de fenol a rosa y luego a color cereza. La reacción generalmente aparece después de 2 h a 4 h. *Salmonella* tiene reacción negativa.

Caldo L-Lisina decarboxilasa: a partir del cultivo puro inocular con una aguja de inoculación por debajo de la superficie del caldo. Incubar a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 h ± 2 h.

Reacción positiva: coloración violeta

Reacción negativa: coloración amarilla

Salmonella da reacción positiva.

Medio para Voges- Proskauer (VP): Resuspender un ansada de la colonia sospechosa en un tubo estéril con 3 ml de caldo VP, Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 h ± 3 h después de la incubación agregar 2 gotas de la solución de creatina, 3 gotas de la solución alcohólica de 1-naftol y 2 gotas de la solución de KOH; agitar después del agregado de cada reactivo.

Medio para reacción de indol: Resuspender una ansada de la colonia sospechosa en un tubo estéril con 5 ml de caldo triptona – triptofano. Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 h ± 3 h. Despues de la incubación agregar 1 ml de reactivo de Kovacs.

Reacción positiva: formación de un anillo rojo

Reacción negativa: formación de un anillo amarillo – marrón.

Salmonella da reacción negativa.

V. EXPRESIÓN DE RESULTADOS:

De acuerdo a los resultados de la interpretación indicar presencia o ausencia de *Salmonella* en la cantidad de muestra analizada (por gramos o mililitros para muestras líquidas).

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Bliga. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL	31/04/2018





TITULO: MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN DE *Salmonella spp.*

POE Nº : 07	Revisión Nº - 01	Fecha de aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 4 de 4

REFERENCIAS:

- ISO 6579: 2002 / Cor. 1: 2004. Método Horizontal para la Detección de *Salmonella spp.*

REDACCION:

BLGA. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL

APROBACION:

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	07 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES:

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	



TITULO: NUMERACIÓN DE MOHOS Y LEVADURAS

POE N° : 08	Revisión N° - 01 Fecha de Revisión: 06-04-2018	Fecha de aplicación: 23-04-2018 Página: 1 de 3
-------------	---	---

I. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología para realizar el recuento de mohos y levaduras en muestras de alimentos.

II. ALCANCE

Laboratorio de salud ambiental.

III. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Agua de dilución: Solución de agua peptonada al 0,1 % o Agua buffer fosfato.
- Agar oxitetraciclina glucosa extracto de levadura (OGYE)
- Oxitetraciclina al 0,1%.
- Placas de Petri
- Pipetas de 10, 5 y 1 ml de capacidad, graduadas con divisiones de 0.1 ml, o pipetas automáticas con tips estériles
- Baño de agua termorregulado a $47^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para mantener el agar fundido.
- Estufa de incubación regulada entre el rango de 22°C a 25°C ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).
- Cuenta colonias modelo Quebec
- Reactivos Tinción de Gram o Reactivos para Tinción Simple.
- Equipo para mezclado (tipo stomacher)
- Agitador mecánico (tipo vortex)
- Vasos o recipientes de vidrio de capacidad adecuada (para homogenizar la muestra), resistente a esterilización en autoclave.
- Balanza de 2,000g de capacidad y una sensibilidad de 0,1g.

IV. PROCEDIMIENTO:

- Preparar la suspensión inicial y diluciones decimales sucesivas como se indica en el punto 6.3.5 del presente manual.
- Pipetear por duplicado a placas Petri estériles alícuotas de 1 mL de la muestra si es producto líquido o 1mL de la dilución 10^{-1} en el caso de otros productos.
- Agregar 15 mL de agar fundido y temperado a $47^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Sembrar por lo menos dos diluciones consecutivas por duplicado.
- El tiempo transcurrido entre la preparación de la suspensión inicial y el momento de agregar el agar no debe exceder de los 15 min.
- Mezclar el inóculo con el medio fundido con movimientos de vaivén.
- Una vez solidificado el agar, NO INVERTIR las placas.
- Incubar a $22 - 25^{\circ}\text{C}$ durante 3 a 5 días.

Nombre de Responsable Bla. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL	Fecha de término de registro 31/04/2018
--	--



TITULO: NUMERACIÓN DE MOHOS Y LEVADURAS

POE Nº : 08	Revisión Nº - 01	Fecha de aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 2 de 3

V. CALCULO Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS.

Usar un equipo cuenta colonias y contar las placas que contengan menos de 150 colonias.

Si parte de la placa presenta desarrollo excesivo de hongos, o si es difícil contar colonias aisladas en menos tiempo, registrar los recuentos obtenidos y registrar el período de incubación, ya sea tres o cuatro días e incluirlo en el informe final.

No contar las placas antes de 3 días de incubación, la manipulación podría provocar colonias secundarias por dispersión de esporas.

Contar las colonias de mohos las que se presentan bajo una forma filamentosa característica (micelio) de color variable. Estas se desarrollan más tarde que las levaduras.

Contar las colonias de levadura por separado, las cuales se presentan en forma de colonias opacas, blancas o amarillas.

El número de Mohos y Levaduras por gramo o mL de alimento se determina según la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\Sigma C}{(n1+0,1n2)xd}$$

donde :

N = número de colonias por ml o g de producto

ΣC = suma de todas las colonias contadas en todas las placas

n1 = número de placas contadas de la menor dilución.

n2 = número de placas contadas de la dilución consecutiva.

d = dilución de la cuál fue obtenido el primer recuento

Se informa Recuento de Mohos por gramo o mL de alimento y Recuento de Levaduras por gramo o mL de alimento.

Aproximar el resultado a dos cifras significativas. Si el tercer dígito es 6, 7, 8 o 9 adicionar una unidad al segundo dígito. Si el tercer dígito es 1, 2, 3 o 4 considerar solamente los dos primeros dígitos. Cuando el tercer dígito es 5, agregar una unidad al segundo dígito si este es impar y mantener el segundo dígito si este es par. Usar ceros para los demás dígitos hacia la derecha.

Si todas las placas de ambas diluciones no presentan crecimiento o desarrollo, informar como menor de uno por el valor recíproco de la dilución menor por g o mL.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Biga, SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL	31/04/2018





TITULO: NUMERACIÓN DE MOHOS Y LEVADURAS

POE Nº : 08	Revisión Nº - 01	Fecha de aplicación: 23-04-2018
	Fecha de Revisión: 06-04-2018	Página: 3 de 3

REFERENCIAS:

- ISO 7954, Microbiología: orientación general para la enumeración de levaduras y mohos. Técnica de recuento de colonias a 25 ° C. Primera edición 1987

REDACCION:

BLGA. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL

APROBACION:

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	07 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES:

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

