



## Resolución Directoral

Lima, 12 de



### 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 desconcentrados 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 Aguas 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 del agua para uso y consumo humano;

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° 050-2016/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 Agua, 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 Aguas 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 Pagina Web de la Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este.

**Regístrese y comuníquese**

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

Distribución:

- ( ) DG
- ( ) DMGS
- ( ) DA
- ( ) Archivo

|   |   |                                      |
|---|---|--------------------------------------|
|  | DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE<br>LABORATORIO REFERENCIAL DE SALUD PÚBLICA DIRIS<br>LIMA ESTE | LABORATORIO<br>DE SALUD<br>AMBIENTAL |
|---|---|--------------------------------------|

## MINISTERIO DE SALUD

### DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE

### LABORATORIO REFERENCIAL DE SALUD PUBLICA LIMA ESTE LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL



Ministerio de Salud  
Dirección de Redes  
Integradas de Salud  
Lima Este

# MANUAL DE PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS ESTANDARIZADOS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DE AGUAS

Anexo 211 Lab.  
Fech. 2018

Lima, 2018





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

**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                    | 7    |
| 5.1 DEFINICIONES                                | 7    |
| 5.2 SIGLAS Y BREVIATURAS                        | 8    |
| VI.  DISPOSICIONES ESPECIFICAS                  | 9    |
| 6.1 TOMA DE MUESTRA                             | 9    |
| 6.1.1 DE AGUA POTABLE                           | 10   |
| 6.1.2 DE AGUA DE POZO                           | 10   |
| 6.1.3 DE AGUA DE PISCINAS                       | 10   |
| 6.1.4 DE AGUA NO POTABLE                        | 10   |
| 6.2 CONSERVACION Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA     | 10   |
| 6.3 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO | 11   |
| 6.3.1 RECEPCIÓN                                 | 11   |
| 6.3.2 MANIPULACIÓN                              | 11   |
| 6.3.3 DILUCIONES                                | 11   |
| 6.3.4 FILTRACIÓN                                | 12   |
| 6.3.5 INOCULACIÓN E INCUBACIÓN                  | 13   |
| 6.4 CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS           | 13   |
| VII.  RESPONSABILIDADES                         | 13   |
| VIII. BIBLIOGRAFIA                              | 13   |

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

|     |   |    |
|-----|---|----|
| IX. | LISTA DE PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS ESTANDARIZADOS                                     | 14 |
|     | POE 01: RECUENTO DE BACTERIAS HETEROTRÓFICAS. METODO DE CONTEO EN PLACA               | 15 |
|     | POE 02: NUMERACIÓN DE COLIFORMES TOTALES. MÉTODO DE FILTRACIÓN DE MEMBRANA            | 20 |
|     | POE 03: NUMERACIÓN DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES. MÉTODO DE FILTRACIÓN DE MEMBRANA    | 25 |
|     | POE 04: DETECCION DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . MÉTODO DE FILTRACIÓN DE MEMBRANA | 29 |
|     | POE 05: DETECCION DE <i>Staphylococcus aureus</i> . MÉTODO DE FILTRACIÓN DE MEMBRANA  | 31 |
|     | POE 06: DETECCION DE PROTOZOOS Y HELMINTOS PARASITOS                                  | 33 |



## INTRODUCCION

Mediante la evaluación fisicoquímica y microbiológica del agua se obtienen datos sobre la calidad de ésta, mínimamente se debe considerar en la evaluación, los niveles de turbiedad, pH, cloro residual (total, combinado, libre), coliformes totales y coliformes termotolerantes. Los valores máximos permisibles de los parámetros de calificación de la calidad del agua están establecidos en las normas vigentes.

Las Guías para la Calidad del Agua Potable de la Organización Mundial de la Salud indican que en un programa de vigilancia y control no es práctico monitorear cada uno de los agentes patógenos debido a que para su detección se requieren procedimientos complejos y un tiempo largo para la obtención de resultados; es suficiente la identificación de un grupo determinado de microorganismos con significado higiénico y sanitario. En el caso del agua para consumo humano, comúnmente se utiliza a los coliformes como indicadores de contaminación por heces de seres humanos y animales de sangre caliente.

La realización de frecuentes exámenes para determinar si el agua contiene organismos indicadores de contaminación fecal sigue siendo el modo más sensible y específico de estimar la calidad de agua desde el punto de vista de la higiene.

A través del agua también se pueden transmitir las parasitosis intestinales, que son infecciones producidas por parásitos cuyo hábitat natural es el aparato digestivo del hombre. Afectan a individuos de todas las edades, pero especialmente a los infantes, a los niños y a los adultos jóvenes de ambos sexos, prevalecen en áreas rurales o suburbanas, desprovistas de agua potable y alcantarillado.

Por otro lado, encontramos las infecciones o enfermedades asociadas con el contacto recreativo del agua, las cuales se dividen en dos categorías. El primer grupo es la gastroenteritis resultante de la ingestión involuntaria de agua contaminada con desechos fecales. El segundo grupo o categoría de infecciones o enfermedades está asociado principalmente con microorganismos que son autóctonos del medio ambiente, que incluyen a las *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus sp.*, *Legionella sp.*, *Naegleria fowleri*, *Mycobacterium sp.*, y *Vibrio sp.* Las enfermedades transmitidas por el agua causadas por estos organismos incluyen dermatitis o foliculitis, otitis externa, fiebre de Pontiac, granulomas, meningoencefalitis amebiana primaria (PAM) y conjuntivitis. Las enfermedades o infecciones más comunes asociadas con el contacto recreativo con el agua son dermatitis causada por *Pseudomonas aeruginosa* y otitis externa, "oreja de nadador", frecuentemente causada por *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Por todo lo mencionado se hace necesaria la vigilancia sanitaria tanto del agua para consumo humano como las de uso recreativo y establecer los métodos utilizados para el análisis microbiológico y parasitológico de éstas.





## GENERALIDADES

El presente manual de procedimientos operativos estandarizados de Análisis de Agua 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 agua para uso y consumo humano.

### II. OBJETIVOS

- Instruir e informar al personal que labora en el laboratorio de salud ambiental sobre los procedimientos a realizar para los análisis de aguas.
- 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.

Decreto Supremo N° 007-2003-SA. "Reglamento Sanitario de Piscinas."

Decreto Supremo N° 031-2010-SA / Ministerio de Salud. Dirección General de Salud Ambiental. "Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo Humano".

Resolución Ministerial N° 527-2016/MINSA. Directiva Sanitaria N° 033 - MINSA/DIGESA - V.02. "Directiva Sanitaria para la determinación del índice de calificación sanitaria de las piscinas públicas y privadas de uso colectivo".

## V. DISPOSICIONES GENERALES

### 5.1 DEFINICIONES

#### **Agua potable:**

Aquella que es apta para consumo humano y que satisface las condiciones y requisitos físicos, químicos, organolépticos y microbiológicos; es decir, sin olor ni color, libre de cualquier gusto objetable.

#### **Aguas recreativas**

Incluyen piscinas de agua dulce, bañeras de hidromasaje y aguas dulces y marinas naturales.

#### **Piscinas**

Es un cuerpo de agua de tamaño limitado contenido en una estructura de contención. El agua de la piscina generalmente es potable y se trata con desinfectante adicional, pero también puede provenir de manantiales termales o agua salada.

#### **Calidad del agua**

Para decir si un agua es de calidad deseable para un propósito particular su calidad debe ser especificada en términos de uso.

#### **Indicadores microbianos de la calidad de agua**

Se refiere a organismos que su sola presencia indica contaminación con las heces de los seres humanos y los animales de sangre caliente, estos son principalmente.

#### **Coliformes**

Bacterias Gram negativas en forma de bastoncillos, que pueden desarrollarse en presencia de sales biliares u otros agentes tensoactivos con propiedades de inhibición del desarrollo similares y fermentan la lactosa entre 35 y 37 °C produciendo ácido, gas y aldehído en plazo de 24 a 48 horas. Son también oxidasa negativa y no forman esporas. No todas se encuentran en las heces, por lo que limita la utilidad de este grupo como indicador de la contaminación fecal, sin embargo, en las aguas tratadas no deberían detectarse bacterias Coliformes y cuando las hay, se puede pensar que el tratamiento ha sido insuficiente, que ha ocurrido una contaminación posterior o que la cantidad de nutrientes es excesiva. Por consiguiente, la prueba de los Coliformes puede utilizarse como indicador de la eficiencia del tratamiento y de la integridad de su distribución (OMS.1996).

#### **Coliformes fecales**

Estas bacterias se definen como el grupo de organismos Coliformes que pueden fermentar la lactosa entre 44 y 45 °C, comprende especies del género *Escherichia* y en menor grado, especies de los géneros *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*. Se transmiten por medio de los excrementos.

#### ***Escherichia coli***

Esta bacteria pertenece a la familia de las enterobacteriáceas y se caracteriza por poseer enzimas b-galactosidasa y b-glucoronidasa. Se desarrolla a 44-45 °C en medios complejos. Fermenta la lactosa y el manitol liberando ácido y gas y produce indol a partir



del triptófano, no produce oxidasa ni hidroliza la urea. Se encuentra normalmente en la flora intestinal del hombre y en el de otros animales de sangre caliente. Su identificación completa es demasiado complicada para utilizar en forma sistemática por lo que se han elaborado pruebas que permitan identificación rápida con un alto grado de certidumbre.

#### **Bacterias heterotróficas**

Son indicadoras del nivel de higiene y estima la densidad de bacterias heterótrofas viables, capaces de desarrollar en condiciones de nutrición, temperatura y tiempo de incubación a 35°C por 48 horas. A esta temperatura de incubación se consigue un desarrollo homogéneo de la flora bacteriana que existe en aquellos momentos. Un recuento total elevado debe alertar de una contaminación bacteriana extraña al ecosistema, de la misma forma un recuento bajo o inferior a 100 por ml, indicará agua de buena calidad. (OMS.1996).

**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.

## **5.2 SIGLAS Y ABREVIATURAS**

**POE:** Procedimiento Operativo Estandarizado

**DIRIS:** Dirección de redes integradas de salud

**UFC:** Unidades formadoras de colonia

**LST :** Caldo Lauril Sulfato Triptosa

**BVB:** Caldo Bilis Verde Brillante

**NaOH:** Hidroxido de sodio

## **VI. DISPOSICIONES ESPECIFICAS**

### **6.1 TOMA DE MUESTRAS**

Para la toma de muestras de agua se debe tener en cuenta los siguientes criterios generales:

- Las muestras para el examen microbiológico deben ser recolectadas en botellas de plástico o vidrio de borosilicato no reactivas que se hayan limpiado y enjuagado cuidadosamente con agua desionizada o destilada y se hayan esterilizado.
- Las muestras de agua para consumo humano tratada y sometida a un proceso de desinfección con cloro se deben coleccionar en un frasco esterilizado al cual, antes de la esterilización, se le hayan adicionado solución de tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) suficiente para neutralizar la acción del cloro. Para tomar muestras de efluentes clorados de aguas residuales, agregar suficiente  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  a una botella de muestra limpia y estéril para obtener una concentración de 100 mg / L en la muestra. En un



frasco de 120 ml, 0,1 ml de una solución al 10% de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  neutralizarán una muestra que contiene aproximadamente 15 mg / l de cloro residual.

- Para las muestras de agua potable, la concentración de agente decolorante se puede reducir: 0.1 ml de una solución al 3% de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  en un frasco de 120 ml neutralizarán hasta 5 mg / l de cloro residual.
- Para muestras de agua con alto contenido de metales, incluido cobre o zinc ( $> 1,0 \text{ mg / L}$ ), y muestras de aguas residuales con alto contenido de metales pesados recoger las muestras en botellas que contengan un agente quelante que reducirá la toxicidad del metal. Esto es particularmente significativo cuando tales muestras están en tránsito durante 4 horas o más. Se deberán adicionar en el frasco de recolección, antes de su esterilización, 0,3 mililitros de una solución de ácido etilendiaminotetracético-EDTA al 15% para cada 100 mililitros de muestra.
- La solución de EDTA puede ser adicionada a un frasco de recolección sola o combinada con una solución de tiosulfato de sodio.
- Al recolectar la muestra dejar un amplio espacio de aire en la botella (al menos 2.5 cm) para facilitar la mezcla por agitación, antes del examen.
- Recoger muestras que sean representativas del agua que se está probando, usando técnicas asépticas para evitar la contaminación de la muestra.
- Retirar el tapón o la tapa evitando la contaminación de su superficie interna y del cuello de la botella. Llenar el recipiente sin enjuagar, volver a colocar el tapón o la tapa.
- El volumen de muestra debe ser suficiente para llevar a cabo todas las pruebas requeridas, preferiblemente no menos de 100 ml.
- Acompañar las muestras con datos descriptivos y de identificación completos y precisos. No aceptar para el examen muestras inadecuadamente identificadas.
- Las muestras para análisis parasitológico deben ser recolectadas en frascos limpios no necesariamente esterilizados, en un volumen de por lo menos un litro.

#### 6.1.1 DE AGUA POTABLE

- Si la muestra de agua debe tomarse de un grifo del sistema de distribución sin accesorios, seleccionar un grifo que suministre agua desde una tubería de servicio conectada directamente con la tubería principal.
- Desinfectar el grifo (adentro y afuera) aplicando una solución de hipoclorito de sodio (100 mg  $\text{NaOCl}$  / L), abrir el grifo completamente y dejar correr el agua durante 2 o 3 minutos o durante un tiempo suficiente para permitir que se limpie la línea de servicio.
- Reducir el flujo de agua para permitir el llenado de la botella sin salpicar.
- No tomar muestras de grifos que goteen y permitan que el agua fluya por el exterior del grifo.
- Al tomar muestras de un grifo mezclador, retirar los accesorios del grifo, como la pantalla o la protección contra salpicaduras, hacer correr agua caliente durante 2 minutos, luego agua fría durante 2 a 3 minutos y tomar la muestra como se indicó anteriormente.
- En las áreas rurales, la evaluación fisicoquímica y microbiológica se efectuará en muestras colectadas en la zona o punto de abastecimiento. En el caso de que la comunidad cuente con una planta de tratamiento, se considerará un muestreo a la salida de la planta, la red de distribución y las conexiones domiciliarias.
- Si en determinada comunidad la desinfección se realiza in situ, es conveniente efectuar un muestreo dentro de los hogares, con el objetivo de evaluar el impacto de la desinfección, el almacenamiento o la manipulación intradomiciliaria del agua.

### 6.1.2 DE AGUA DE POZO

- Si la muestra debe tomarse de un pozo equipado con una bomba de mano, bombear agua durante aproximadamente 5 a 10 minutos o hasta que la temperatura del agua se haya estabilizado antes de recoger la muestra.
- Si no hay maquinaria de bombeo, recolectar una muestra directamente del pozo por medio de una botella esterilizada con un peso en la base; tener cuidado para evitar la contaminación de las muestras por cualquier residuo de la superficie. Con un pedazo de cordón, amarrar una piedra de tamaño apropiado al frasco de muestra. Antes lavar la piedra a fin de evitar la incorporación de microorganismos al agua del pozo. Amarrar el frasco al cordón de una longitud necesaria para el muestreo según la profundidad del pozo, atar el frasco y luego destaparlo.
- Ubicar el frasco de muestreo en un punto alejado de las paredes del pozo y lentamente dejar descender el frasco dentro del pozo. El peso de la piedra facilitará su descenso.
- Llenar el frasco sumergiéndolo completamente hasta una profundidad de 30 centímetros aproximadamente.
- Si el frasco estuviera completamente lleno, desechar parte del agua hasta que aproximadamente un tercio del frasco quede vacío.
- Colocar la tapa del frasco

### 6.1.3 DE AGUA DE PISCINAS

- Por ser un agua clorada recogerla en frascos que contengan tiosulfato de sodio, ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ).
- Recoger las muestras retirando cuidadosamente la tapa de una botella de muestra estéril y sosteniéndola cerca de la base en un ángulo de 45 grados.
- Realizar un barrido lento hacia abajo a través del agua, con la boca de la botella siempre delante de la mano.
- Evitar la contaminación de la muestra por restos flotantes.
- No enjuagar la botella (es decir, retener tiosulfato de sodio).
- Para las piscinas equipadas con un filtro, las muestras se pueden recoger de las llaves de muestreo provistas en las líneas de retorno y descarga del filtro.

### 6.1.4 DE AGUA NO POTABLE

- Tomar muestras de un río, arroyo, lago o embalse sosteniendo la botella cerca de su base en la mano y hundiéndola, con el cuello hacia abajo, debajo la superficie.
- Girar la botella hasta que el cuello apunte ligeramente hacia arriba y la boca se dirija hacia la corriente. Si no hay corriente, como en el caso de un depósito, crear una corriente artificialmente empujando la botella hacia adelante horizontalmente en una dirección alejada de la mano.

## 6.2 CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

- Las muestras deben ser transportadas en contenedores y entregadas al laboratorio en el menor tiempo posible.
- Para el caso de análisis microbiológicos y si fueran muestras de agua cloradas, preservar con tiosulfato de sodio al 10% según como se indica en el punto 6.1 y transportarlas refrigeradas entre 4 °C a < 8° C.



- Para el caso de análisis parasitológicos no se requieren ningún aditivo y se puede transportar a temperatura ambiente o refrigerada entre 1 ° C y 10 ° C.
- 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.

### 6.3 PROCESAMIENTO DE LAS 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 y las 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. Si es posible, examinar las muestras dentro de las 6 horas de recibirlas, sino es posible no exceder las 24 horas.

#### 6.3.2 MANIPULACION

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

El análisis microbiológico de muestras de agua debe realizarse tan pronto como sea posible después de la recolección para evitar cambios impredecibles en la población microbiana.

#### 6.3.3 DILUCIONES

Si las muestras de agua son muy turbias o se sospecha de un recuento elevado de bacterias, es recomendable realizar diluciones, para lo cual se debe homogenizar la muestra unas 25 veces invirtiendo el frasco y traspasando una porción de la muestra (10ml) en la solución diluyente (90ml) de esta manera se obtiene la dilución 10<sup>-1</sup>. Si es necesario se realizan, más diluciones.

La solución diluyente utilizada es la Solución Tampón de Fosfato, que se prepara de la siguiente manera:

##### Solución Stock A

Disolver 34g de Potasio dihidrógeno fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) en 500ml de agua destilada, ajustar el pH a 7,2 ± 0,5 con hidróxido de sodio al 1N, y completar el volumen a un litro con agua destilada. Autoclavar por 15 minutos a 121°C.

##### Solución Stock B

Disolver 81,1g de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O) en un litro de agua destilada. Autoclavar por 15 minutos a 121°C.

##### Solución Completa:

Agregar 1,25ml de la solución stock A y 5ml de la solución stock B a un litro de agua destilada. Distribuir en frascos en cantidades de 90 ± 2ml y Autoclavar por 15 minutos a 121°C





#### 6.3.4 FILTRACION

- Usar unidades de filtración estéril al comienzo de cada serie de filtración como precaución mínima para evitar la contaminación accidental. Una serie de filtración se considera interrumpida cuando transcurre un intervalo de 30 minutos o más entre las filtraciones de muestra. Después de dicha interrupción, tratar cualquier filtración adicional de la muestra como una nueva serie de filtración y esterilizar todos los portafiltros de membrana en uso.
- Descontaminar los embudos de filtración al inicio del procesamiento de cada muestra humedeciendo el embudo con alcohol y luego flambearlo (si el material lo permite), una vez que el alcohol se consume hacer pasar suficiente agua estéril para lavar el sistema y enfriarlo más rápidamente. Si el material no se puede someter al calor, exponer todas las superficies del conjunto previamente limpiado a la radiación ultravioleta (exposición de 2 minutos) para la desinfección inicial antes del uso en el procedimiento de prueba, o antes de reutilizar unidades entre sucesivas series de filtración.
- Preparar el sistema de filtración, para esto colocar un matraz entre la bomba de vacío y el matraz que sostiene el portafiltros.
- Retirar la parte superior del portafiltros y, con una pinza previamente flameada al mechero y fría, colocar un filtro de membrana estéril, con la cara cuadrículada hacia arriba y en el centro de la parte superior del portafiltros.
- Usar filtros de membrana con un diámetro de poro clasificado ( $0.45 \mu\text{m} \pm 0.02 \mu\text{m}$ ) de tal manera que haya una retención completa de los organismos que se cultivarán, estabilidad en el uso, ausencia de sustancias químicas extraíbles que pueden inhibir el crecimiento y desarrollo bacteriano, una velocidad de filtración satisfactoria (en 5 min), ausencia de influencia significativa en el pH del medio (más de  $\pm 0.2$  unidades) y aumento del número de colonias o esparcidores confluentes. Utilizar membranas con rejilla de tal manera que el crecimiento bacteriano no se vea inhibido ni estimulado a lo largo de las líneas de la cuadrícula cuando las membranas con bacterias atrapadas se incuban en un medio adecuado. Preferiblemente usar filtros de membrana preesterilizados para los cuales el fabricante haya certificado que la técnica de esterilización no ha inducido toxicidad ni alterado las propiedades químicas o físicas de la membrana. Si las membranas se esterilizan en el laboratorio, esterilice en autoclave durante 10 minutos a  $121^\circ \text{C}$ .
- Posicionar el embudo sobre éste y asegúrelo en su lugar.
- Homogeneizar la muestra agitándola vigorosamente 25 veces.
- Verter 30 mililitros de agua destilada estéril con el fin de humedecer la membrana. Filtrar
- Verter 100 mililitros de la muestra de agua. Filtrar.
- Después de la filtración de la muestra, enjuagar el portafiltros tres veces con porciones de 20-30 mililitros de agua de dilución estéril, para evitar la retención de alguna bacteria en las paredes internas. Evitar que se seque la membrana.
- Apagar la bomba de vacío al finalizar la operación.
- Separar la parte superior del portafiltros y, con una pinza previamente flameada y fría, retirar la membrana cuidando de que la pinza toque apenas la parte periférica, fuera del área de filtración.
- Acoplar nuevamente la parte superior del portafiltros a la parte inferior.
- Colocar la membrana sobre la placa con medio de cultivo seleccionado para cada método.



- El enjuague entre muestras evita la contaminación por arrastre. Cada vez que se procesen muestras incorporar un control de esterilidad del agua de dilución. Si se procesa un mayor número de muestras incorporar este control cada 10 muestras, insertando una muestra de agua de enjuague estéril (100 ml) e incubándola en las mismas condiciones que las muestras a analizar.
- Para muestras de agua no potable, preferiblemente descontaminar la unidad de filtro después de cada muestra (como se describió anteriormente) debido al alto número de bacterias coliformes presentes en estas muestras.
- Cuando se va a filtrar menos de 10 ml de muestra (diluida o sin diluir), agregar aproximadamente 10 ml de agua de dilución estéril al embudo antes de filtrar o pipetee el volumen de la muestra en un frasco de dilución estéril, luego filtrar toda la dilución. Este aumento en el volumen de agua ayuda a una dispersión uniforme de la suspensión bacteriana sobre toda la superficie filtrante efectiva.

### 6.3.5 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

Los cálculos y la expresión de resultados 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

- CEPIS/OPS (2004). Manual para análisis básicos de calidad del agua de bebida. Lima, CEPIS/OPS.
- SMEWW.APHA, AWW, WEF. 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.



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

## IX. LISTA DE PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS ESTANDARIZADOS

- Recuento de bacterias heterotróficas. Método de conteo en placa.
- Numeración de coliformes totales. Método de filtración por membrana.
- Numeración de coliformes termotolerantes. Método de filtración por membrana.
- Detección de *Pseudomonas aeruginosa*. Método de filtración por membrana.
- Detección de *Staphylococcus aureus*. Método de filtración por membrana.
- Detección de Protozoos y Helmintos parásitos





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

**TITULO: RECuento DE BACTERIAS HETEROTRÓFICAS. METODO DE CONTEO 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 el método de ensayo para calcular el número de bacterias heterotróficas vivas en muestras de agua.

**II. ALCANCE**

Laboratorio de salud ambiental.

**III. MUESTRA:**

Agua de uso y consumo humano.

**IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS**

- Agar Plate Count (Tryptona glucosa extracto de levadura agar), se podría usar agar R2A.
- Agua de dilución (solución tampón fosfato).
- Frascos con capacidad de 100ml, autoclavables.
- Pipetas serológicas de 10ml o pipetas automáticas con tips estériles
- Pipetas de 1 ml de capacidad, graduadas con divisiones de 0.1 ml, o pipetas automáticas con tips estériles.
- Placas Petri de vidrio o descartables de 100 x 15mm estériles.
- Estufa de incubación: 35°C ± 0.5°C
- Baño de agua o equipo similar capaz de mantener la temperatura entre 44°C y 47°C
- Equipo contador de colonias

**V. PROCEDIMIENTO:**

- Realizar un número adecuado de diluciones para que el número total de colonias en una placa esté entre 30 y 300.
- Usar pipetas estériles para las transferencias iniciales y posteriores de cada muestra.
- No preparar diluciones ni verter las placas a la luz solar directa.
- Fundir el medio de agar sólido estéril en agua hirviendo o por exposición al flujo de vapor en un recipiente parcialmente cerrado y mantener el medio fundido en un baño de agua entre 44 y 46 ° C hasta que se use.
- Pipetear 1 ml, 0.1 ml u otro volumen adecuado de muestra en una placa de Petri estéril.
- Al examinar aguas residuales o aguas turbias, no medir un inóculo de 0.1 mL de la muestra original, preparar una dilución apropiada.

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



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

**TITULO: RECuento DE BACTERIAS HETEROTRÓFICAS. METODO DE CONTEO EN PLACA**

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

- Preparar al menos dos placas replicadas para cada dilución de muestra utilizada.
- Después de depositar la muestra para cada serie de placas, verter 10 a 12 ml de medio licuado mantenido a 44 a 46 ° C en cada placa evitando derramar el medio en el exterior del recipiente o en el interior de la tapa del recipiente.
- Mezclar bien el medio derretido con las muestras en la placa de Petri, girando la placa primero en una dirección y luego en la dirección opuesta, o girando e inclinando. No dejar transcurrir más de 20 min entre el inicio del pipeteado y el vertido de las placas.
- Dejar que las placas se solidifiquen (en 10 min) en una superficie nivelada. Después de que el medio solidifique, invierta las placas y colóquelas en la incubadora a 35 ° C durante 48 h. Mantener la humedad dentro de la incubadora para que las placas no tengan una pérdida de peso por humedad superior al 15%. Esto es especialmente importante si se usa una incubación prolongada. Una bandeja de agua colocada en la parte inferior de la incubadora puede ser suficiente. Para incubación prolongada en incubadoras no humedecidas, selle las placas en bolsas de plástico.
- Realizar controles de esterilidad para verificar la esterilidad de las muestras de agua de dilución vertiendo placas de control para cada serie de muestras.
- Inmediatamente después de la incubación contar todas las colonias en placas seleccionadas. Si el conteo se debe retrasar temporalmente, guardar las placas entre 5 y 10 ° C durante no más de 24 h.
- Utilizar un auxiliar de conteo aprobado, como el contador de colonia de Quebec, para contar manualmente. Si dicho equipo no está disponible, contar con cualquier otro contador siempre que proporcione una ampliación e iluminación equivalentes.
- Considerar solo las placas que tienen de 30 a 300 colonias para determinar el recuento de placas.
- Calcular el recuento de bacterias por mililitro multiplicando el número promedio de colonias por placa por el recíproco de la dilución utilizada. Informar como UFC por mililitro.

**VI. CALCULO Y EXPRESION DE RESULTADOS**

- Para calcular el recuento de bacterias heterotróficas, UFC / ml, multiplicar el número total de colonias o el número promedio (si hay placas duplicadas de la misma dilución) por placa por el recíproco de la dilución utilizada.

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





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

**TITULO: RECuento DE BACTERIAS HETEROTRÓFICAS. METODO DE CONTEO EN PLACA**

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

- Cuando se cuentan las colonias en placas duplicadas y / o diluciones consecutivas y se promedian los resultados antes de registrarlas, redondear los recuentos a dos cifras significativas. Suba el segundo dígito al siguiente número más alto cuando el tercer dígito de la izquierda sea 5, 6, 7, 8 o 9; usar ceros para cada dígito sucesivo hacia la derecha desde el segundo dígito.
- Por ejemplo, informe un recuento de 142 como 140 y un recuento de 155 como 160, pero informe un recuento de 35 como 35.
- Si solo hay placas que tienen más de 300 colonias, usar la(s) placa(s) con un recuento cercano a 300 colonias. Calcular el recuento multiplicando el conteo promedio por placa por el recíproco de la dilución utilizada e informar como UFC estimada por mililitro.
- Si las placas de todas las diluciones de cualquier muestra no tienen colonias, informe el conteo como menos de una ( $<1$ ) veces el recíproco de la dilución más baja correspondiente. Por ejemplo, si no hay desarrollo de colonias en la dilución 1: 100, reportar el recuento como menos de 100 ( $<100$ ) UFC estimadas / ml.
- Si el número de colonias por placa supera con creces los 300, no informar el resultado como "muy numeroso para contar" (MNPC). Si hay menos de 10 colonias / cm<sup>2</sup>, contar las colonias en 13 cuadrados (del contador de colonias) con distribución representativa de colonias y multiplicar la suma por 5 para calcular las colonias estimadas por placa cuando el área de la placa es de 65 cm<sup>2</sup>. Cuando hay más de 10 colonias / cm<sup>2</sup>, contar cuatro cuadrados representativos, tomar el conteo promedio por centímetro cuadrado, y multiplicar por el factor apropiado para estimar las colonias por placa. El factor es 57 para placas de plástico desechables y 65 para placas de vidrio.
- Cuando los recuentos bacterianos en placas superpobladas son mayores que 100 colonias / cm<sup>2</sup>, informar el resultado como mayor que ( $>$ ) 6500 veces el recíproco de la dilución más alta para placas de vidrio o mayor que ( $>$ ) 5700 veces el recíproco para placas plásticas. Informar como unidades formadoras de colonias estimadas por mililitro.
- Por ejemplo, si la dilución es 10<sup>-2</sup> y se inoculó 1 ml de muestra:  $6500 \times 1/10^{-2} = 6,5 \times 10^5$ . Y se reporta como:  $>65 \times 10^4$  (E) UFC/ml.
- Si se encuentran "colonias expansivas" en la(s) placa(s) seleccionada, cuente colonias en porciones representativas solo cuando las colonias estén bien distribuidas en áreas libres de colonias expansivas y éstas no exceda la mitad de la placa.

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





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

|   |                                      |  |
|---|--------------------------------------|--|
| <b>TITULO: RECuento DE BACTERIAS HETEROTRÓFICAS. METODO DE CONTEO EN PLACA</b>  |                                      |  |
| <b>POE Nº : 01</b>  | <b>Revisión Nº - 01</b>              | <b>Fecha de aplicación: 23-04-2018</b> |
|   | <b>Fecha de Revisión: 06-04-2018</b> | <b>Página: 4 de 5</b>                  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Si se encuentran "colonias expansivas" en la(s) placa(s) seleccionada, cuente colonias en porciones representativas solo cuando las colonias estén bien distribuidas en áreas libres de colonias expansivas y éstas no exceda la mitad de la placa.</li> <li>• Al contabilizar las colonias expansivas, se cuenta cada uno de los siguientes tipos como uno solo: una cadena de colonias que parece ser causada por la desintegración de un grupo bacteriano, ya que el agar y la muestra se mezclaron; una película de crecimiento entre el agar y el fondo de la placa de Petri; y una colonia que se forma en una película en el borde o sobre la superficie del agar.</li> <li>• Si hay exceso de crecimiento expansivo en una placa, considerar como diseminante.</li> <li>• Cuente como colonias individuales las colonias de apariencia similar que crecen muy cerca pero que no se tocan, siempre que la distancia entre ellas sea al menos igual al diámetro de la colonia más pequeña. Cuente colonias incipientes que difieren en apariencia, como morfología o color, como colonias individuales.</li> <li>• Informar como unidades formadoras de colonias. Incluya en el informe el método utilizado, la temperatura y el tiempo de incubación y el medio.</li> </ul> |                                      |  |
| <b>Nombre de Responsable</b>  | <b>Fecha de término de registro</b>  |  |
| Blga. SANDRA ELIZABETH<br>VELASQUEZ CORONEL<br>LABORATORIO DE SALUD<br>AMBIENTAL  | 31/04/2018                           |  |



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

**TITULO: RECUENTO DE BACTERIAS HETEROTRÓFICAS. METODO DE CONTEO 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:**

SMEWW. APHA, AWW, WEF. 2012. Standard methods for examination of water & wastewater Part. 9215B, 22nd Edition. RECUENTO DE BACTERIAS HETEROTRÓFICAS. MÉTODO DE CONTEO EN PLACA

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

**TITULO: NUMERACIÓN DE COLIFORMES TOTALES. MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA**

|             |                               |                                 |
|-------------|-------------------------------|---------------------------------|
| POE Nº : 02 | Revisión Nº - 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 el método de ensayo para calcular el número de coliformes totales en muestras de agua.

**II. ALCANCE**

Laboratorio de salud ambiental.

**III. MUESTRA:**

Agua de uso y consumo humano.

**IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS**

- Agar M-Endo Les o medio m-Endo
- Almohadillas o *pads* esterilizados (en caso de usar el medio de cultivo líquido).
- Agua de dilución (solución tampón fosfato).
- Caldo Lauril Sulfato Triptosa (LST)
- Caldo Bilis Verde Brillante (BVB)
- Agua peptonada estéril al 1% y pH neutro.
- Etanol al 95%
- Incubadora de aire caliente a  $35 \pm 0.5$  °C
- Frascos con capacidad de 100ml, autoclavables.
- Pipetas serológicas de 10ml y 1 ml de capacidad, graduadas o micropipetas con tips estériles.
- Placas Petri de vidrio o descartables de 50 mm de diámetro aproximadamente u otro tamaño adecuado estériles.
- Baño de agua o equipo similar capaz de mantener la temperatura entre 44°C y 47°C
- Equipo de filtración: Vasos de filtración plásticos de 47 mm de diámetro; Bomba de vacío 15 cm Hg y < 25 Bar de presión; kitasato de 1 litro.
- Filtros de nitrocelulosa cuadrículados estériles
- Equipo de recuento: Microscopio estereoscópico binocular o lupa, con magnificación de 10X o 15X (optativo). y una fuente de luz fluorescente posicionada formando un ángulo de 60-80° con la placa.
- Mecheros
- Pinzas de acero inoxidable para filtros, sin extremidades rugosas
- Asas o agujas de nicrón o platino iridio
- Tubos de ensayo autoclavables con tapa, de 16mm x 150 mm.
- Tubos Durham, de diámetro no inferior al 40% del diámetro del tubo de ensayo, debiendo quedar completamente lleno y sumergido en el medio de cultivo.

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



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

**TITULO: NUMERACIÓN DE COLIFORMES TOTALES. MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA**

|             |                               |                                 |
|-------------|-------------------------------|---------------------------------|
| POE Nº : 02 | Revisión Nº - 01              | Fecha de aplicación: 23-04-2018 |
|             | Fecha de Revisión: 06-04-2018 | Página: 2 de 5                  |

**V. PROCEDIMIENTO**

- Identificar las placas con lápiz de vidrio o tinta indeleble en el área externa de la base.
- Los medios de cultivo deben estar preparados con anterioridad y a temperatura ambiente.
- Si se trabaja con caldo selectivo estéril, abrir la placa de petri estéril con una pinza esterilizada al fuego y colocar una almohadilla o pad, con una pipeta estéril, agregar 2 mililitros de caldo selectivo: medio m-Endo para coliformes totales, cuidadosamente retire el exceso de medio mediante la decantación de la placa.
- Si se decide trabajar con agar, distribuir con una pipeta estéril entre 3 y 5 mililitros del agar licuado (a 45 °C aproximadamente) a la placa de petri estéril. Tapaarla y dejar solidificar el medio antes de proceder al análisis.
- Se puede realizar diluciones si fuera necesario, para lo cual el agua de dilución debe estar a temperatura ambiente.
- Homogeneizar la muestra agitándola vigorosamente 25 veces.
- Filtrar 30 mililitros de agua destilada estéril con el fin de humedecer la membrana.
- Filtrar 100 mililitros de la muestra de agua. Filtrar.
- Retirar con una pinza estéril el filtro de membrana y colocarla sobre la placa con medio de cultivo, directamente sobre agar, o directamente en la almohadilla, según sea el caso.
- incubación a  $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  en posición invertida durante el tiempo adecuado según el origen de la muestra.
- Las muestras que consisten en aguas tratadas pueden incluir microorganismos estresados que presentan un crecimiento más lento y demoran entre 22 - 24 hrs en manifestar el brillo verde metálico. Por el contrario, si el origen de la muestra son aguas naturales las colonias típicas de coliformes pueden observarse entre las 16 a 18 hrs de incubación pudiéndose perder el brillo verde metálico a las 24 horas de incubadas.
- Para el recuento utilizar preferentemente un microscopio binocular con un aumento de 10 o 15X y una fuente de luz fluorescente posicionada formando un ángulo de  $60-80^{\circ}$  con respecto al filtro.
- Cuente las colonias de coliformes típicas y atípicas.
- Las colonias típicas de coliformes son aquellas rojas o rosado oscuro que presentan brillo verde metálico en la superficie ya sea como un pequeño punto o en toda la superficie de la colonia.

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





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

**TITULO: NUMERACIÓN DE COLIFORMES TOTALES. MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA**

|             |                               |                                 |
|-------------|-------------------------------|---------------------------------|
| POE N° : 02 | Revisión N° - 01              | Fecha de aplicación: 23-04-2018 |
|             | Fecha de Revisión: 06-04-2018 | Página: 3 de 5                  |

- Las colonias coliformes atípicas pueden ser de color rojo oscuro, mucoides o nucleadas sin brillo. En general, las colonias rosas, azules, blancas o incoloras que carecen de brillo se consideran no coliformes.

**VI. TEST CONFIRMATIVO COLIFORMES**

Inocular al menos 5 colonias típicas y 5 atípicas, en caldo LST y caldo BVB, simultáneamente e incubar por 48 hrs. a 35 +/- 0,5° C y observar la formación de gas. Si los tubos de caldo BVB, resultan negativos, y los de caldo LST presentan gas, traspasar los tubos positivos nuevamente a caldo BVB, e incubar 48 hrs. a 35 +/- 0,5° C. Observar la formación de gas en los tubos de fermentación de BVB, la presencia de gas y crecimiento en caldo BVB, confirma la colonia como coliformes.

**VII. CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS**

- El recuento de colonias se realiza en filtros que contengan entre 20 y 80 colonias de coliformes típicas y no más de 200 colonias de cualquier tipo. Los resultados deben expresarse por Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/ 100 mL.

La ecuación que se emplea es la siguiente:

$$UFC \text{ de coliformes totales}/100 \text{ mL} = \frac{\text{Nº colonias coliformes contadas}}{\text{Volumen filtrado de muestra (mL)}} \times 100$$

- Para los recuentos de coliformes verificados, ajustar el recuento inicial según el porcentaje de verificación positiva e informar como "recuento de coliformes verificado / 100 ml".

$$\text{Porcentaje de coliformes verificadas} = \frac{\text{Nº de colonias verificadas}}{\text{Nº total de colonias coliformes sujetas a verificación}} \times 100$$

- Si no se observan colonias de coliformes, informar como "<1 coliforme / 100 ml".
- Si las colonias crecen uniéndose sobre la membrana se informa como crecimiento confluyente con o sin presencia de coliformes y se sugiere la realización de otro muestreo del mismo punto.

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



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

**TITULO: NUMERACIÓN DE COLIFORMES TOTALES. MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA**

|             |                               |                                 |
|-------------|-------------------------------|---------------------------------|
| POE N° : 02 | Revisión N° - 01              | Fecha de aplicación: 23-04-2018 |
|             | Fecha de Revisión: 06-04-2018 | Página: 4 de 5                  |

- Si el número de colonias típicas de coliformes fuera entre 20 y 80 pero la placa posee más de 200 colonias de cualquier tipo, se informa como mayor al recuento realizado y se aconseja la realización de otro muestreo en ese punto.
- Para el agua potable, la presencia de coliformes en dichos cultivos que no muestran brillo puede confirmarse transfiriendo unas pocas colonias o colocando todo el cultivo de filtro de membrana en un tubo estéril de caldo de lactosa bilis verde brillante. Si se produce gas a partir del tubo de caldo bilis verde brillante dentro de las 48 h  $35 \pm 0.5^{\circ} \text{C}$ , hay coliformes.
- Para muestras no válidas, solicitar una nueva muestra de la misma ubicación dentro de las 24 horas y seleccionar los volúmenes más apropiados para filtrar por membrana, observando el requisito de que la porción de agua potable estándar sea de 100 ml, por lo tanto, para reducir la interferencia de la sobrepoblación, en lugar de filtrar 100 ml por membrana, filtrar porciones de 50 ml a través de dos membranas, porciones de 25 ml a través de cada una de las cuatro membranas, etc.
- El total está dado por los recuentos de coliformes observados en todas las membranas e informar como número por 100 ml.

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





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

**TITULO: NUMERACIÓN DE COLIFORMES TOTALES. MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA**

|             |                               |                                 |
|-------------|-------------------------------|---------------------------------|
| POE N° : 02 | Revisión N° - 01              | Fecha de aplicación: 23-04-2018 |
|             | Fecha de Revisión: 06-04-2018 | Página: 5 de 5                  |

**REFERENCIAS:**

SMEWW. APHA, AWW, WEF. 2012. Standard methods for examination of water & wastewater, Part. 9222B, 22nd Edition. TÉCNICA DE FILTRO DE MEMBRANA PARA MIEMBROS DEL GRUPO COLIFORME. PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DEL FILTRO DE MEMBRANA PARA COLIFORMES TOTALES

**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 | 02 MAYO 2018 |
| Garantía de Calidad   |                             |              |

**REVISIONES:**

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



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

**TITULO: NUMERACIÓN DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES. MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA**

|             |                               |                                 |
|-------------|-------------------------------|---------------------------------|
| POE N° : 03 | Revisión N° - 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 el método de ensayo para calcular el número de coliformes termotolerantes en muestras de agua.

**II. ALCANCE**

Laboratorio de salud ambiental.

**III. MUESTRA:**

Agua de uso y consumo humano.

**IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS**

- Medio M-FC o caldo M-FC
- Almohadillas o pads esterilizados (en caso de usar el medio de cultivo líquido).
- Agua de dilución (solución tampón fosfato).
- Agua peptonada estéril al 1% y pH neutro.
- Solución de ácido rosólico al 1% en NaOH al 0,2N
- Caldo EC -MUG
- Incubadora de aire caliente a  $44,5 \pm 0,5$  °C
- Frascos con capacidad de 100ml, autoclavables.
- Pipetas serológicas de 1 y 10ml de capacidad, graduadas o micropipetas con tips estériles
- Placas Petri de vidrio o descartables de 50 mm de diámetro aproximadamente u otro tamaño adecuado estériles.
- Baño de agua o equipo similar capaz de mantener la temperatura entre 44°C y 47°C
- Equipo de filtración: Vasos de filtración plásticos de 47 mm de diámetro; Bomba de vacío 15 cm Hg y < 25 Bar de presión; kitasato de 1 litro.
- Filtros de nitrocelulosa cuadrículados estériles
- Equipo de recuento: Microscopio estereoscópico binocular o lupa, con magnificación de 10X o 15X (optativo).
- Mecheros
- Pinzas de acero inoxidable para filtros, sin extremidades rugosas
- Asas o agujas de nicrón o platino iridio
- Tubos de ensayo autoclavables con tapa, de 16mm x 150 mm.
- Tubos Durham.
- Lámpara luz ultravioleta de onda larga (rango 365-366 nm)

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





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

**TITULO: NUMERACIÓN DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES. MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA**

|             |                               |                                 |
|-------------|-------------------------------|---------------------------------|
| POE N° : 03 | Revisión N° - 01              | Fecha de aplicación: 23-04-2018 |
|             | Fecha de Revisión: 06-04-2018 | Página: 2 de 4                  |

**V. PROCEDIMIENTO**

- Identificar las placas con lápiz de vidrio o tinta indeleble en el área externa de la base.
- Los medios de cultivo deben estar preparados con anterioridad y a temperatura ambiente.
- Si se utiliza medio líquido, colocar una almohadilla absorbente estéril en cada placa de cultivo y pipetear al menos 2,0 ml de medio M-FC, preparado para saturar la almohadilla. Eliminar con cuidado cualquier exceso de líquido de la placa de cultivo por decantación de la placa.
- Si se trabaja con agar, distribuir con una pipeta estéril entre 3 y 5 mililitros del agar licuado (a 45 °C aproximadamente) a la placa de Petri estéril. Taparla y dejar solidificar el medio antes de proceder al análisis.
- Se puede realizar diluciones si fuera necesario, para lo cual el agua de dilución debe estar a temperatura ambiente.
- Homogeneizar la muestra agitándola vigorosamente 25 veces.
- Filtrar 30 mililitros de agua destilada estéril con el fin de humedecer la membrana.
- Filtrar 100 mililitros de la muestra de agua.
- Retirar con una pinza estéril el filtro de membrana y colocarla sobre la placa con medio de cultivo, directamente sobre agar, o directamente en la almohadilla, según sea el caso.
- Incubar durante  $24 \pm 2$  a  $44,5 \pm 0,2$  °C.
- Para el recuento utilizar preferentemente un microscopio binocular con un aumento de 10 o 15X y una fuente de luz fluorescente posicionada formando un ángulo de 60-80° con respecto al filtro.
- Contar las colonias de típicas de coliformes fecales que son de varios tonos de azul. Las colonias coliformes no fecales son de color gris a crema. Normalmente, se observarán pocas colonias de coliformes no fecales en medio debido a la acción selectiva de la temperatura elevada y la adición de reactivo de sal de ácido rosólico.

**VI. VERIFICACIÓN**

- Seleccionar 5 colonias azules típicas e inocular cada una en un tubo con medio EC e incubar a  $44,5 \pm 0,2$  °C por 24 h.
- La formación de gas confirma la colonia como coliformes termotolerantes.
- A la vez se puede inocular en medio EC-MUG con incubación a  $44,5 \pm 0,2$  °C durante 24h observar bajo una fuente de luz ultravioleta, los tubos que presenten crecimiento y formación de gas, esto confirma la presencia de *E. coli*.

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



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

**TITULO: NUMERACIÓN DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES. MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA**

|             |                               |                                 |
|-------------|-------------------------------|---------------------------------|
| POE N° : 03 | Revisión N° - 01              | Fecha de aplicación: 23-04-2018 |
|             | Fecha de Revisión: 06-04-2018 | Página: 3 de 4                  |

**VII. CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS**

El recuento de colonias se realiza en filtros que contengan entre 20 y 60 colonias termotolerantes. Los resultados deben expresarse por Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/ 100 mL.

La ecuación que se emplea es la siguiente:

$$\text{UFC de coliformes termotolerantes/100 mL} = \frac{\text{Nº colonias coliformes termotolerantes contadas} \times 100}{\text{Volumen filtrado de muestra (mL)}}$$

Para los recuentos de coliformes verificados, ajuste el recuento inicial según el porcentaje de verificación positiva e informe como "recuento de coliformes termotolerantes verificado / 100 ml".

$$\begin{array}{l} \text{Porcentaje de coliformes} \\ \text{Verificadas} \end{array} = \frac{\text{Nº de colonias verificadas}}{\text{Nº total de colonias coliformes sujetas a verificación}} \times 100$$

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





|   |  |   |
|---|--|---|
|  | <b>DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE</b><br><b>LABORATORIO REFERENCIAL DE SALUD PÚBLICA DIRIS</b><br><b>LIMA ESTE</b> | <b>LABORATORIO</b><br><b>DE SALUD</b><br><b>AMBIENTAL</b> |
|---|--|---|

**TITULO: NUMERACIÓN DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES. MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA.**

|             |                               |                                 |
|-------------|-------------------------------|---------------------------------|
| POE N° : 03 | Revisión N° - 01              | Fecha de aplicación: 23-04-2018 |
|             | Fecha de Revisión: 06-04-2018 | Página: 4 de 4                  |

**REFERENCIAS:**

SMEWW. APHA, AWW, WEF. 2012. Standard methods for examination of water & wastewater, Part. 9222D, 22nd Edition. TÉCNICA DE FILTRO DE MEMBRANA PARA MIEMBROS DEL GRUPO COLIFORME. PROCEDIMIENTO DE FILTRO DE MEMBRANA PARA COLIFORMES TERMOTOLERANTES (fecales).

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

**TITULO: DETECCION DE *Pseudomonas aeruginosa*. MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA.**

|             |                               |                                 |
|-------------|-------------------------------|---------------------------------|
| POE N° : 04 | Revisión N° - 01              | Fecha de aplicación: 23-04-2018 |
|             | Fecha de Revisión: 06-04-2018 | Página: 1 de 2                  |

**I. OBJETIVO**

El presente procedimiento tiene como objetivo describir el método de ensayo para determinar la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en muestras de agua.

**II. ALCANCE**

Laboratorio de salud ambiental.

**III. MUESTRA:**

Agua de uso y consumo humano.

**IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS**

- Agar cetrimide
- Estufa de incubación: 41.5 °C ± 0.5°C
- Equipo contador de colonias
- Equipo de filtración: Vasos de filtración plásticos de 47 mm de diámetro; Bomba de vacío 15 cm Hg y < 25 Bar de presión; kitasato de 1 litro; trampa de agua entre el kitasato y la bomba de vacío.
- Filtros de nitrocelulosa cuadrículados estériles
- Mecheros
- Pinzas de acero inoxidable para filtros, sin extremidades rugosas
- Asas o agujas de nícrón o platino iridio

**V. PROCEDIMIENTO**

- Filtrar 200 ml o menos de aguas naturales o hasta 500 ml de aguas de piscina a través de filtros de membrana estériles.
- Colocar cada membrana en una placa con cetrimide.
- Invertir las placas e incubar a 41.5 ± 0.5 ° C durante 72 h.
- Típicamente, las colonias de *P. aeruginosa* tienen un diámetro de 0,8 a 2,2 mm y apariencia plana con bordes exteriores livianos y centros de parduzco a negro verdoso.
- Contar las colonias típicas, preferiblemente de filtros que contienen de 20 a 80 colonias.

**VI. INTERPRETACIÓN Y EL CÁLCULO DE LA DENSIDAD**

La confirmación no se requiere de forma rutinaria.

Los resultados se informan como número presuntivo de *P. aeruginosa*/ 100 ml.

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





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

**TITULO: DETECCION DE *Pseudomonas aeruginosa*. MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA.**

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

**REFERENCIAS:**

SMEWW. APHA, AWW, WEF. 2012. Standard methods for examination of water & wastewater Part. 9213E, 22nd Edition. TECNICA DE FILTRACIÓN DE MEMBRANA PARA *Pseudomonas aeruginosa*

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

**TITULO: DETECCIÓN DE *Staphylococcus aureus*. MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA.**

|             |                               |                                 |
|-------------|-------------------------------|---------------------------------|
| POE N° : 05 | Revisión N° - 01              | Fecha de aplicación: 23-04-2018 |
|             | Fecha de Revisión: 06-04-2018 | Página: 1 de 2                  |

**I. OBJETIVO**

El presente procedimiento tiene como objetivo describir el método de ensayo para determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* en muestras de agua.

**II. ALCANCE**

Laboratorio de salud ambiental.

**III. MUESTRA:**

Agua de uso y consumo humano.

**IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS**

- Agar Baird Parker
- Caldo infusión cerebro corazón.
- Plasma de conejo
- Estufa de incubación: 35°C ± 0.5°C
- Equipo de filtración
- Filtros de nitrocelulosa cuadrículados estériles
- Mecheros
- Pinzas de acero inoxidable para filtros, sin extremidades rugosas
- Asas o agujas de nícrón o platino iridio

**V. PROCEDIMIENTO**

- Filtrar la muestra de agua como se ha indicado en los métodos anteriores.
- Colocar el filtro de membrana en agar Baird-Parker e incubar a 35 ± 0.5 ° C durante 48 ± 4 h.
- Los estafilococos forman colonias de color gris pizarra a negro azabache, lisas y enteras.
- Para realizar la verificación sembrar cada colonia sospechosa en caldo infusión cerebro corazón e incubar a 35 ± 0.5 ° C durante 24h ± 2h, pasado el tiempo agregar 0.1 ml de cada cultivo en 0.3 ml de plasma de conejo 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.

**VI. EXPRESION DE RESULTADOS**

Los resultados se expresan como presencia de *Staphylococcus aureus*/100ml.

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





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

**TITULO: DETECCION DE *Staphylococcus aureus*. MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA.**

|             |                               |                                 |
|-------------|-------------------------------|---------------------------------|
| POE N° : 05 | Revisión N° - 01              | Fecha de aplicación: 23-04-2018 |
|             | Fecha de Revisión: 06-04-2018 | Página: 2 de 2                  |

**REFERENCIAS:**

SMEWW. APHA, AWW, WEF. 2012. Standard methods for examination of water & wastewater Part. 9213B, 22nd Edition. PRUEBA DE ESTAFILOCOCOS O *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                                      |                             |



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

|  |                               |                                 |
|--|-------------------------------|---------------------------------|
| <b>TITULO: DETECCION DE PROTOZOOS Y HELMINTOS PARASITOS</b>  |                               |                                 |
| POE N° : 06  | Revisión N° - 01              | Fecha de aplicación: 23-04-2018 |
|  | Fecha de Revisión: 06-04-2018 | Página: 1 de 3                  |
| <p><b>I. OBJETIVO</b><br/>El presente procedimiento tiene como objetivo describir el método de ensayo para determinar la presencia de protozoos y helmintos parásitos en muestras de agua.</p> <p><b>II. ALCANCE</b><br/>Laboratorio de salud ambiental.</p> <p><b>III. MUESTRA:</b><br/>Agua de uso y consumo humano.</p> <p><b>IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Envases limpios para la recolección de muestras</li> <li>• Equipo de filtración: Vasos de filtración plásticos de 47 mm de diámetro; Bomba de vacío 15 cm Hg y &lt; 25 Bar de presión; kitasato de 1 litro; trampa de agua entre el kitasato y la bomba de vacío.</li> <li>• Filtros de nitrocelulosa cuadrículados estériles de 2 <math>\mu\text{m} \pm 0.02 \mu\text{m}</math> de diámetro de poro o menos.</li> <li>• Pinzas de acero inoxidable para filtros, sin extremidades rugosas</li> <li>• Microscopio</li> <li>• Tubos de centrifuga de polipropileno graduado de 15 ml o 50 ml</li> <li>• Gradillas</li> <li>• Espátula de plástico descartable</li> <li>• Placas Petri</li> <li>• Láminas y laminillas</li> <li>• Suero fisiológico al 0,85%</li> <li>• Lugol</li> </ul> <p><b>V. PROCEDIMIENTO</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Homogenizar bien las muestras antes de filtrar</li> <li>• Filtrar un volumen adecuado de la muestra de agua según sea la procedencia. Para agua de piscina se filtra un litro de agua y para agua potable por lo menos dos litros.</li> <li>• Si la filtración empieza a ser lenta por obstrucción del filtro de membrana, dejar que termine de filtrar la muestra contenida en el embudo de filtración, apagar el sistema al vacío y retirar el filtro de membrana y colocar uno nuevo para proseguir con la filtración.</li> </ul> |                               |                                 |
| Nombre de Responsable  | Fecha de término de registro  |                                 |
| Blga. SANDRA ELIZABETH VELASQUEZ CORONEL   | 31/04/2018                    |                                 |
| LABORATORIO DE SALUD AMBIENTAL   |                               |                                 |





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

**TITULO: DETECCION DE PROTOZOOS Y HELMINTOS PARASITOS**

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

**REFERENCIAS:**

SMEWW. APHA, AWW, WEF. 2012. Standard methods for examination of water & wastewater, Part. 9711, 22nd Edition.

Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de los Parásitos Intestinales del Hombre. Serie de Normas Técnicas N°37, 2da Edición. 2014.

**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                                      |                             |

