

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



PROPUESTA DE UN MANUAL DE PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS PARA UN LABORATORIO DE
MICROBIOLOGÍA

TRABAJO DE GRADUACIÓN
PRESENTADO POR:
FLORES HERNÁNDEZ ASUNCIÓN DE MARIA.
HERNÁNDEZ ROSALES ELVA LILIAN.
HINDS ORELLANA FLORENCE PATRICIA.

16 DE FEBRERO
PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA

MARZO 2005
SAN SALVADOR, EL SALVADOR CENTRO AMÉRICA.



©2004, DERECHOS RESERVADOS

Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador

<http://virtual.ues.edu.sv/>

SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTORA

DRA. MARIA ISABEL RODRIGUEZ

SECRETARIA GENERAL

LICDA. ALICIA MARGARITA RIVAS DE RECINOS

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIA:

MSc. MIRIAM DEL CARMEN RAMOS DE AGUILAR

COMITÉ DE TRABAJOS DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

LICDA. MARIA CONCEPCION ODETTE RAUDA ACEVEDO

ASESORA DE AREA ANÁLISIS DE ALIMENTOS

DRA. GLORIA RUTH CALDERON

ASESORA DE AREA INDUSTRIA FARMACEUTICA, COSMÉTICA Y
VETERINARIA

LICDA MERCEDES ROSSANA BRITO DE GAMEZ

DOCENTES DIRECTORES

MSc. CORALIA FIGUEROA DE MURILLO

MSc. MARIA EVELYN SANCHEZ DE RAMOS

AGRADECIMIENTOS

A DIOS TODOPODEROSO

Por habernos dado la capacidad de alcanzar una de nuestras tantas metas propuestas. Por habernos dado el valor para enfrentar situaciones adversas en las cuales hemos fallado, pero gracias a él hemos sabido seguir adelante a pesar de tantos obstáculos y tropiezos en los momentos más difíciles de nuestras vidas personales y profesionales

A NUESTROS CATEDRATICOS

Por brindarnos los conocimientos necesarios y la luz para poder entender y asimilar las enseñanzas en el mundo del saber.

A NUESTRAS ASESORAS

- MSc. Maria Evelyn de Ramos
- MSc. Coralia Figueroa de Murillo

Por habernos brindado el tiempo, la dedicación y la paciencia en el ordenamiento de las ideas necesarias para la elaboración y estructuración de nuestro trabajo de graduación.

Finalmente queremos agradecer de manera especial a

- Ing. Evelyn Xiomara Castillo

Quien cooperó de manera desinteresada en la realización de este trabajo.

A TODAS LAS PERSONAS QUE DE UNA U OTRA MANERA NOS
BRINDARON SU APOYO EN TODO MOMENTO

“GRACIAS”...

FLORES/ HERNANDEZ/ HINDS.

DEDICATORIA

A DIOSITO TODOPODEROSO

Por ser el dador de sabiduría, entendimiento, por darme el espíritu de lucha y perseverancia para salir a delante, permitiendo alcanzar una de mis tantas anheladas metas.

A MIS PADRES

Rafael Antonio Flores y Luz Adelina de Flores, con infinito amor, por todo su amor, entrega y dedicación, por el apoyo moral, económico e incondicional que me han brindado a través de mi formación personal y profesional.

A MIS HERMANOS

Doris, Silvia, Rina, Goretty, Tony, por todo su amor, comprensión y apoyo, por sus palabras de aliento impulsándome siempre a salir a delante.

A MIS SOBRINOS

Que con su amor, alegrías y juegos disiparon en mi los momentos de tensión y estrés.

A MIS CUÑADOS

Por su cariño, apoyo y consejos, por hacer suyos mis alegrías y tristezas

A MIS AMIGAS Y COMPAÑERAS DE TESIS

Elvita y Florence, por brindarme su amistad sincera, por todas sus muestras de cariño, afecto comprensión y optimismo en los momentos más difíciles de la carrera, por una y mil noches de desvelo para poder terminar nuestro trabajo de graduación.

Finalmente

A mis amigos(as), compañeros(as) de trabajo y a todas las personas que de una u otra manera me brindaron su apoyo y comprensión.

“GRACIAS, QUE DIOSITO LOS BENDIGA”

Mery Flores.

DEDICATORIA

EN PRIMER LUGAR A MI PADRE DIOS TODOPODEROSO:

Por brindarme su amor, espíritu de lucha, consuelo en todo momento, por la sabiduría necesaria, permitiéndome culminar este peldaño en mi vida y por el futuro que me tiene preparado.

A MIS PADRES:

José Ángel Hernández y María Felicita Rosales, por su amor, comprensión, apoyo, dedicación y esmero en educarme y brindarme los medios necesarios a lo largo de toda mi vida y en toda la carrera; de forma muy especial a mi padre que aunque ya no está físicamente conmigo, siempre permanecerá en mi corazón

A MIS HERMANOS(AS):

Jorge, Antonio, María, Miguel, Rosa, por su comprensión y cariño, especialmente a Alfonso y Tere por brindarme su apoyo y animarme en momentos difíciles de la carrera a seguir adelante para alcanzar esta meta propuesta.

A MIS SOBRINOS (AS):

Javier, Marcos, Adam, Cristal, Kevin, Lukas, por su cariño y formar parte de mi vida.

A MIS AMIGAS Y COMPAÑERAS DE TESIS:

Florence y Mery, por brindarme su cariño y amistad sincera y por estar conmigo en todo momento con su apoyo incondicional y soportarme en la elaboración del presente trabajo.

A todos mis amigos y amigas en especial a Sandra, Jessica, Rosy, Yani por su amistad, alegría, cariño y por todos los momentos compartidos.

A todas las personas que no aparece su nombre pero que de una u otra forma colaboraron desinteresadamente en la elaboración de este trabajo.

“QUE DIOS LOS BENDIGA SIEMPRE”

Elva Lilian Hernández Rosales.

DEDICATORIA

A DIOS TODOPODEROSO

Por darme la sabiduría, los medios y el tiempo necesarios para culminar mis estudios.

A MI MADRE

Por brindarme su amor y apoyo a todo lo largo de la carrera y a lo largo de toda mi vida.

A MIS HERMANOS

Harold y Lizzie por el cariño y ayuda que me han dado día con día .

A MIS CUÑADOS

A mi cuñada y colega Luz Elena por su amistad y aportes, y a mi cuñado Eduardo por darme ánimo a cada instante.

A MIS AMIGAS Y COMPAÑERAS

Elva y Mery por su esfuerzo y dedicación en la elaboración del presente trabajo y por cada momento vivido.

A MI ESPOSO

Alfredo por su ayuda y comprensión en esta última etapa de mi carrera.

A mis demás familiares y amigos que han estado y estarán siempre conmigo

¡GRACIAS!

Florence Patricia Hinds.

INDICE

ABREVIATURA

RESUMEN

I INTRODUCCIÓN xx

II OBJETIVO

CAPITULO III

3. Marco Teórico

3.1. Manuales de Procedimiento 24

3.2. Los Alimentos como vehículo de contaminación 25

3.3. Microorganismos indicadores 27

3.4. Características propias de cada grupo de microorganismos 28

3.5. Papel que desempeña el ente normalizador en el país 38

CAPITULO IV

4. Diseño metodológico 43

CAPITULO V

5. Laboratorios acreditados que realizan análisis microbiológicos-
en El Salvador 47

5.1. Laboratorio de calidad integral de la Fundación Salvadoreña
para el Desarrollo Social (FUSADES) 48

5.2. Laboratorio de Especialidades Microbiológicas
Industriales (ESMI) 51

5.3.	Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos y Aguas del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS)	52
5.4.	Laboratorios Especializados en Control de Calidad (LECC)	55
5.5.	Entrevista a los Laboratorios que se encuentran acreditados – en el país y que realizan análisis microbiológicos en alimentos	57

CAPITULO VI

6.	Generalidades de la acreditación	72
6.1.	Organismo Nacional de Acreditación	73
6.2.	Requerimientos con los que un Laboratorio debe contar para- obtener la acreditación (ISO / IEC 17025)	75
6.3.	Reglamento de Acreditación de Laboratorio de Ensayo y - Análisis	86
6.4.	Lineamientos para la Acreditación	99

CAPITULO VII

7.	Manual de Procedimientos Normalizados	
7.1.	Procedimientos Normalizados de Análisis	106
7.1.1.	Aislamiento e identificación de <i>Yersinia enterocolitica</i>	107
7.1.2.	Aislamiento e identificación de <i>shigella sp</i>	118
7.1.3.	Aislamiento e identificación de <i>Listeria monocytogenes</i>	129
7.1.4.	Aislamiento e identificación de <i>Campylobacter jejuni</i>	146
7.1.5.	Aislamiento e identificación de <i>Vibrio vulnificus</i>	176
7.1.6.	Recuentos de Mohos y levaduras	191

7.1.7. Aislamiento e identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	201
7.1.8. Aislamiento e identificación de <i>Clostridium botulinum</i>	218
7.1.9. Aislamiento e identificación de <i>E. coli</i> , bacterias- Coliformes	230
7.1.10. Aislamiento e identificación de <i>Salmonella sp</i>	247
7.1.11. Recuento e identificación de bacterias heterótrofas	279

CAPITULO VIII

8. Instrucciones de Manejo de equipo	
8.1. Antecedentes del Centro de Investigación y Desarrollo- en Salud (CENSALUD)	289
8.2. Instrucciones de Manejo de Equipo	295
8.2.1. Manejo de balanza electrónica COBOS	297
8.2.2. Manejo de baños termostáticos serie BA	307
8.2.3. Manejo de Agitador Eléctrico	311
8.2.4. Manejo de Cámara de flujo laminar vertical	318
8.2.5. Manejo de Baño Termostático	326
8.2.6. Manejo de incubador por CO ₂	336
8.2.7. Manejo de Armario Refrigeradores	346
8.2.8. Manejo de Autoclave	354
8.2.9. Manejo y uso de Contador de Colonias COMECTA	365
8.2.10. Manejo y uso de Freezer	370

8.2.11.	Manejo de Agitador Magnético Eléctrico	
	AGIMATIC- N	377
8.2.12.	Manejo y uso de Microscopio ECLIPSE E 400	
	NIKON	382
8.2.13.	Manejo y uso de Circulador STOMACHER 400	399
CAPITULO IX		
9.	Interpretación de Resultados	414
CAPITULO X		
10.	Conclusiones	417
CAPITULO XI		
11.	Recomendaciones	420
	Bibliografía	
	Glosario	
	Anexos.	

ABREVIATURAS

AEY	Agar Yema de huevo.
AID	Asesores Internacionales para el Desarrollo.
AG	Agar Gelatina.
AGS	Agar Inclinado de Glucosa Arginina
AHB	Agar Abeyta-Hunt-bark
AOAC	Asociación de Químicos Análíticos Oficiales.
APS	Caldo Peptona Sal alcalino.
APW	Agua Peptonada Alcalina.
ATCC	Colección de Cultivos tipo Americano
BHI	Caldo Cerebro Corazón.
BS	Agar Bismuto Sulfito.
Caldo MR-VP	Rojo de Metilo- Voges proskaver
CCDA	Agar campylobacter Modificado libre de sangre.
CENSALUD	Centro de Investigación y Desarrollo en Salud.
CIN	Agar novobiocin- Irgasan- Celfsulodin.
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.
°C	Grados Centígrados.
db	Decibeles.
DBO	Demanda Biológica de Oxígeno.

EB	Caldo de enriquecimiento de listeria.
EEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogena.
EIA	Ensayo para Enzima Inmune
ESMI	Laboratorio de Especialidades Microbiológicas Industriales.
EY	Yema de huevo.
FDA	Federación de Drogas y Alimentos.
FUSADES	Laboratorio de Calidad Integral de la Fundación Salvadoreña para el Desarrollo Social
g	Gramo.
GS	Agar Sal Gelatina.
HE	Agar entérico de Hektoen.
HEPA	Arrastre de partículas de alta eficiencia
HIA	Agar Inclinado de Infusión de Corazón.
ICAITI	Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial.
IEC	Comisión Internacional Electrotécnica.
LAIA	Agar hierro Lisina Arginina.
Lb	Libra.
L-BGB	Caldo lactosa verde brillante.
LECC	Laboratorios Especializados en Control de Calidad.
LST	Caldo Lauril Sulfato.

LTB	Caldo Lauril Triptosa.
MCPC	Agar modificado celubiosa- polimixina B colistina.
MIO	Medio para movilidad Indol y Ornitinas
mm	Milímetros
µm	Micrómetro
MSPAS	Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.
N	Normal.
NMCC	Normalización, metrología y certificación de la calidad.
NMP	Número más probable
NSO	Norma Salvadoreña Obligatoria.
NSR	Norma Salvadoreña Recomendada.
OXA	Agar Oxford
Oz	Onza.
PBS	Buffer Fosfato Salino.
PCA	Agar para contaje en caja
PDA	Agar papa dextrosa.
pH	Logaritmo Negativo Equivalente a la concentración de Ión Hidrógeno.
PSBB	Caldo Bilis Sorbitol Peptonado.
RILAA	Red Interamericana de Laboratorios de Análisis de Alimentos.

rpm	Revoluciones por minuto
SC	Caldo Selenito Cistina
Seg	Segundo.
TCBS	Agar tiosulfato- citrato- bilis- sucrosa.
TSA	Algar tripticasa Soya.
TSI	Agar hierro triple azucar.
TSYE	Caldo tripticasa soya- extracto de levadura.
TT	Caldo tetracionato.
UFC	Unidades formadoras de colonias.
VRBA	Agar Bilis Rojo Violeta.
XLD	Agar Xylosa Lisina desoxicolato.

RESUMEN

Todo laboratorio que efectúa análisis microbiológicos deben tener una serie de condiciones para poder ejercer apropiadamente sus funciones, dentro de los que se presentan alguna como su infraestructura, equipo, procedimientos normalizados, y otros aspectos no menos importantes que aseguren la credibilidad en los resultados de los análisis, es por esto que en el presente trabajo se recopila información que permite obtener lo antes mencionado y de esta forma iniciar el proceso acreditación. Lo primero fue conocer los laboratorios locales que se encuentran acreditados y mediante una entrevista se confirmó la calidad de su trabajo.

Posteriormente se propone el manual de procedimientos normalizados que consiste en el procedimiento de análisis de once microorganismos patógenos que afectan la calidad de los alimentos; en ellos se establecen las partes que indica la norma ISO / IEC 17025 al mismo tiempo se dan a conocer los lineamientos y requerimientos que se necesitan para poder acreditarse. Además se incluyen las instrucciones de manejo del equipo básico existente en un laboratorio de Microbiología. De esta manera, con la información recopilada, se pretende mostrar una guía a seguir para cualquier laboratorio que busque mejorar sus condiciones de trabajo.

I- INTRODUCCION

La Alimentación es una de las necesidades básicas de la población, debido a su enorme importancia, se hace necesario conocer que clase de alimentos se consumen, su calidad, no solo nutricional si no también su inocuidad, higiene y apropiada elaboración.

En El Salvador, son muy comunes las enfermedades gastrointestinales tanto en la población adulta como infantil, originadas por el consumo de alimentos cuya calidad Microbiológica es deficiente, es por esto que existen análisis Microbiológicos que ayudan a detectar la presencia de microorganismos patógenos e indeseables en los alimentos.

Debido a la evolución e importancia que han adquirido los análisis microbiológicos, que tienen como objetivo determinar la inocuidad de los alimentos para establecer si es apto o no, para consumo humano; cada día son mayores las exigencias en la calidad de los alimentos por lo que se vuelve una necesidad contar con laboratorios microbiológicos acreditados que efectúen análisis a diversas muestras de alimentos y que disponga de manuales que sirvan de apoyo al personal del laboratorio que orienten de una manera adecuada la ejecución de los análisis en ellos especificados, para llevar un funcionamiento eficiente y contar con procedimientos normalizados que garanticen la calidad de los resultados de los análisis microbiológicos.

Es así como el objetivo de este trabajo es presentar un manual de procedimientos normalizados de análisis microbiológico de alimentos para un laboratorio de microbiología, utilizando el formato de la norma ISO/ IEC 17025, para ser utilizado en el Laboratorio de microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, y en el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) que están en proceso de acreditación y pretende realizar dichos análisis en muestras de alimentos provenientes de diferentes Instituciones y Empresas.

Además se han incluido las Instrucciones de manejo y uso del equipo empleado para realizar los análisis microbiológicos de alimentos utilizados en el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD).

Así como los Requerimientos y Lineamientos para la acreditación de un Laboratorio, información que se canalizó mediante el ente regulador de normas Salvadoreñas CONACYT, que a su vez es el encargado de proporcionar el reconocimiento de la Acreditación.

Este a su vez incluye un resumen de las entrevistas realizadas a profesionales de los Laboratorios que actualmente cuentan con el reconocimiento de la acreditación en el país; presentándose la limitante de no obtener cierta información por ser confidencial y propia de cada Laboratorio.

II- OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Proponer un Manual de Procedimientos Normalizados de Análisis Microbiológico de Alimentos para un Laboratorio de Microbiología.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICO

- 2.2.1 Realizar entrevista a los laboratorios de análisis microbiológicos de alimentos que se encuentran acreditados en el país.
- 2.2.2 Establecer los diagramas de procedimientos y métodos estandarizados a ser utilizados para evaluar la calidad microbiológica de los diferentes alimentos de consumo humano.
- 2.2.3 Establecer las instrucciones de manejo del equipo empleado en el Centro de Investigación y Desarrollo para la Salud (CENSALUD) y en todo laboratorio de análisis microbiológico de alimentos que cuenten con dichos instrumentos.
- 2.2.4 Dar a conocer los Requerimientos y lineamientos a seguir para la acreditación de un laboratorio.



CAPITULO III
MARCO TEÓRICO

3 MARCO TEORICO

3.1 MANUALES DE PROCEDIMIENTOS

Un manual se puede definir como un instrumento al servicio de la calidad y de la capacitación que involucra a todo el personal de laboratorio, cuyo propósito es pasar de una tradición oral a una tradición escrita.

Para asegurar que la información generada por los resultados del laboratorio sea precisa y oportuna, se propone incluir la normalización y estandarización de los procedimientos.

Un procedimiento corresponde a la descripción precisa, concisa y clara del material, equipo, condiciones, actividades y requerimientos para obtener un producto o servicio de una calidad definida.

El manual de procedimientos es el conjunto, no sólo de los procedimientos; si no también individualiza las practicas de la institución a través de los procesos organizacionales técnico administrativos, insumos equipo, medidas de seguridad, limpieza, etc.

Operacionalizar los estándares, garantizar la reproducibilidad de los procesos, capacitar al personal, armonizar las técnicas; hablar el mismo idioma, reducir costos y errores, facilitar auditorias, son las funciones esenciales del manual de procedimientos o guía de buena ejecución de los análisis.

Cada uno de los procedimientos debe cumplir con los siguientes requisitos:

- a) Elaborado por un personal experimentado y responsable

- b) Dirigido a un personal capacitado
- c) Acorde con las normas en vigor en el país o la institución
- d) Idóneo y consensual
- e) Detallado, claro y preciso
- f) Exhaustivo
- g) Instrucciones inequívocas
- h) Accesible y llamativo

El contenido de los procedimientos debe contemplar:

1. Título
2. Fecha de implementación
3. Principios y fundamentos
4. Equipo, instrumentos y reactivos
5. Procedimientos detallados
6. Interpretación de resultados
7. Emisión y entrega de los resultados
8. Referencias bibliográficas
9. Glosario de términos ⁽¹⁴⁾.

3.2 LOS ALIMENTOS COMO VEHÍCULOS DE CONTAMINACIÓN

Los alimentos son la principal fuente de macro y micronutrientes que los seres vivos necesitan para vivir, desarrollarse y llevar a cabo todas las funciones propias del organismo, sin embargo, todos estos nutrientes que contienen los

alimentos son utilizados también por los microorganismos para su propio crecimiento, ocasionando alteración en ellos, causada por modificaciones enzimáticas o síntesis de nuevos compuestos, volviendo al alimento no apto para el consumo humano.

Cuando se trata de microorganismos patógenos, la situación es más peligrosa desde el punto de vista de la salud pública, debido a que los alimentos toleran la multiplicación de estos microorganismos dañinos, o sirven como vectores de los mismos sin producir manifestación alguna en ellos, provocando de esta manera graves enfermedades y hasta epidemias a quienes los consumen en estas circunstancias.

La contaminación de un alimento depende de factores como la cantidad de nutrientes, pH, agua, condiciones ambientales siendo las más importantes la humedad, temperatura y almacenamiento, así como también la presencia de sustancias inhibidoras en su composición; siendo cada uno de los factores anteriores de suma importancia tomarlos en cuenta al momento de fabricar, almacenar y comercializar los alimentos, ya que en cualquiera de las etapas del proceso alimentario-nutricional puede llevarse a cabo algún tipo de contaminación perjudicando la salud de las personas.

Se vuelve entonces imprescindible la inocuidad de todos los alimentos para garantizar así la buena salud y evitar que estos puedan convertirse en agentes transmisores de microorganismos que atenten contra la vida. ⁽¹⁷⁾

3.3 MICROORGANISMOS INDICADORES

Los microorganismos indicadores son aquellas especies cuya presencia indica que los alimentos estuvieron expuestos a condiciones que pudieron determinar la llegada a los mismos de microorganismos peligrosos y permitir la proliferación de especies patógenas o toxigénicas.

La finalidad por la que se usan las bacterias indicadoras como reveladoras de prácticas de higiene inadecuadas es precisamente para poner de manifiesto determinadas condiciones de tratamientos o manipulación de los alimentos que suponen un peligro potencial.

Los microorganismos de este género más comunes son los siguientes:

- a) Bacterias aeróbicas mesófilas: Son microorganismos que crecen a 37 °C y cuyos recuentos se obtienen en placa, los cuales, si son altos, indican la posible proliferación de organismos patógenos dentro del alimento y al mismo tiempo, indican que el alimento va a alterarse muy pronto.
- b) ***Escherichia coli*** y coliformes: La ***E. coli*** es una bacteria cuyo hábitat natural es el tracto digestivo del hombre, por lo tanto, su presencia en los alimentos, es un indicador de contaminación directa o indirecta de origen fecal, lo que implica la presencia simultánea de bacterias patógenas como ***Salmonella typhi, Shigella sp, Vibrios y Entamoebas.***

Los otros coliformes son buenos indicadores de una limpieza y desinfección no adecuada o de una industrialización o tratamiento de alimentos incorrectos, favoreciendo la multiplicación de microorganismos patógenos.

- c) ***Estaphylococcus***: La presencia de ***Estaphylococcus aureus*** en alimentos se interpreta como indicativo de contaminación a partir de la piel, la boca y las fosas nasales de los manipuladores de alimentos, así como de material y equipos sucios y de ineficiente temperatura de conservación.⁽¹⁶⁾

3.4 CARACTERÍSTICAS PROPIAS DE CADA GRUPO DE MICROORGANISMOS.

Se han identificado los siguientes microorganismos como los mayores causantes de enfermedades transmitidas por alimentos, ya sea por la severidad de la enfermedad o por el número de casos que ella produce y sus características son las siguientes:

a) ***Campylobacter jejuni***

Bacilos gramnegativos con formas de coma, S, o “ala de gaviota”. Son móviles y cuentan con un solo flagelo polar y no forman esporas. Para su cultivo se requieren medios selectivos y la incubación debe efectuarse con 5% de O₂ y 10% de CO₂. crece bien a temperatura de 36 a 37⁰ C, pero su incubación a 42 ⁰C impide el crecimiento de la mayor parte de las otras bacterias que se encuentran en el excremento. El medio de cultivo utilizado es el skirrow y el medio BAP de ***Campylobacter***. Las colonias tienden a ser incoloras o grises, pueden ser acuosas y extenderse o ser redondas y convexas, y es posible que se produzcan ambos tipos de colonias con una

placa de agar. Son positivos a la oxidasa y catalasa, y no oxidan o fermentan los carbohidratos.

b) ***Clostridium botulinum***

Los ***Clostridios*** son bacilos grandes móviles gram (+) y anaerobios muchos descomponen proteínas, forman toxinas o ambas cosas.

Las esporas de los ***Clostridios*** son por lo general, mayores que el diámetro de los bacilos que las forman. Crecen solo en condiciones de anaerobiosis. Producen colonias grandes, elevadas, con bordes enteros, y producen hemólisis en agar sangre.

c) ***Yersinia enterocolitica***.

Es un bastoncillo gramnegativo que no fermenta la lactosa y que es positivo a la ureasa y negativo a la oxidasa. Crece mejor a 25 °C y son motiles a esta misma temperatura, pero no lo son a 37 °C. Se encuentran en el tubo intestinal de diversos animales, a los que produce enfermedad y son transmisibles al hombre. Existen mas de 50 serotipos, pero el 01 es el productor de la mayor parte de las infecciones humanas.

Su cultivo se incrementa mediante “enriquecimiento en frío”, se coloca una pequeña cantidad de excremento o el contenido de un hisopo rectal en solución salina y se conserva a 4 °C durante 2 a 4 semanas; muchos microorganismos fecales no sobreviven, ***Yersinia enterocolitica*** se multiplicara.

d) Genero ***Estaphylococcus***

Los ***Estaphylococcus*** son células esféricas Grampositivas que suelen estar distribuidas en grupos irregulares a manera de racimo de uvas. Son células esféricas de cerca de 1 μm de diámetro distribuidas en grupos irregulares; son microorganismos no móviles y no forman esporas.

Los ***Estaphylococcus*** crecen con facilidad en mayor parte de los medios bacteriológicos en condiciones aerobias o microaerofilas, crecen con mayor rapidez a 37 °C; pero forman mejor el pigmento a la temperatura ambiental (20-25 °C). Las colonias en medio sólido son: redondas, lisas, elevadas y resplandecientes.

Estaphylococcus aureus forman colonias de color gris a amarillo dorado intenso y *Estafilococcus epidermidis* son grises a blancas.

Los ***Estaphylococcus*** producen catalasa, fermentan con lentitud muchos carbohidratos y producen ácido láctico pero no gas ⁽²⁵⁾.

e) ***Listeria monocytogenes***

Listeria monocytogenes es un bacilo Grampositivo corto, que no forma esporas, tiene un movimiento rotatorio de un extremo a otro a 22 °C pero no a 37 °C la prueba de movilidad diferencia con rapidez

Listeria crece en medios como: Agar de Mueller-Hinton, la identificación se facilita si los cultivos primarios se hacen en agar que tengan sangre de carnero, debido a que alrededor y debajo de las colonias pueden observarse una zona pequeña característica de hemólisis. El microorganismo es

anaerobio facultativo y positivo a la catalasa. **Listeria** produce ácido pero no gas en presencia de diversos carbohidratos .⁽¹¹⁾

f) Genero **Shigella sp**

Las **Shigella sp** son bastoncillos Gramnegativos delgados, en los cultivos recientes se producen formas cocobacilares, son microorganismos anaeróbios facultativos pero crecen mejor en medio aeróbio.

Las colonias son de forma convexas, circulares y transparentes, alcanzan un diámetro cerca de 2 mm en 24 hrs.

Todas las **Shigella sp** fermentan la glucosa, con excepción de **Shigella sonnei** no fermentan la lactosa. Su incapacidad para fermentar la lactosa distingue a las **Shigella sp** en medios diferenciales, forman ácido a partir de los carbohidratos, pero rara vez producen gas. Se pueden clasificar también en las que fermentan el manitol y las que no lo fermentan.⁽²⁵⁾

g) Genero **Salmonella sp**

Las **Salmonella sp** son bacilos Gramnegativos, la mayor parte de ellas son móviles y tienen flagelos peritricos. Estos microorganismos crecen con facilidad en medios sencillos, pero casi nunca fermentan la lactosa o la sacarosa, forman ácido y a veces gas a partir de la glucosa y manosa, suelen producir H₂S, sobreviven a la congelación en el agua durante períodos prolongados, son resistentes a ciertos productos químicos (Ej. verde brillante, tetracionato de sodio y desoxicolato de sodio) que inhiben a otras bacterias intestinales; por lo tanto estos compuestos son de utilidad

para su inoculación en los medios de cultivo con objeto de aislar a las ***Salmonella sp*** del excremento. ⁽²⁵⁾

h) ***Escherichia coli***

Son bastoncillos gramnegativos cortos que pueden formar cadenas. ***E. coli*** y la mayor parte de todas las bacterias intestinales forman colonias circulares convexas y lisas con bordes definidos.

E. coli fermenta rápidamente la lactosa observándose un resplandor metálico en los diferentes medios, produce de manera típica pruebas positivas a Indol, descarboxilasa de lisina y fermentación del manitol, lo mismo que gas a partir de la glucosa, produce hemólisis en agar sangre. ⁽²⁵⁾

i) ***Escherichia coli*** enteropatogeno. Los serotipos de ***E. coli*** enteropatogenos a los cuales se les ha relacionado con enfermedades diarreicas del hombre o con brotes de intoxicaciones alimentarias han sido denominados ***E. coli*** enteropatogenos (EEC).

La temperatura óptima de crecimiento del microorganismo es de 37 °C con un intervalo de crecimiento de 10 a 4 °C. Su pH óptimo de crecimiento es de 7.0 a 7.5 con un pH mínimo de crecimiento de valor de 4.0 un pH máximo de crecimiento de valor de 8.5. Este microorganismo es relativamente termosensible y puede ser destruido con facilidad a temperatura de Pasteurización y también mediante la apropiada cocción de los alimentos.

j) ***Toxoplasma gondii***

Morfología e identificación.

- Microorganismos típicos: La forma de trofozoitos consiste en células de forma navicular, de pared delgada, que miden 4 a 7x2 μm cuando se encuentran dentro de las células de los tejidos y algo mayores cuando están fuera de ellas. Se tiñen ligeramente con el colorante de Giemsa; las células fijadas, a menudo aparecen en forma de semiluna. Se pueden encontrar agregados intracelulares empaquetados. Los quistes verdaderos se hallan en el encéfalo o en otros tejidos. Estos quistes contienen muchos miles de bradizoitos como esporas capaces de iniciar una nueva infección en un mamífero que ingiere los tejidos que portan los quistes.
- Cultivo: ***Toxoplasma gondii*** solo se puede cultivar en presencia de células vivas, o sea en cultivo celular y en huevos. De esta manera se pueden ver microorganismos típicos y extracelulares.
- Requerimientos de Cultivo: El crecimiento óptimo se lleva a cabo alrededor de 37 a 39 $^{\circ}\text{C}$ en células vivas.
- Variaciones: Existe considerable variación en las cepas por lo que respecta a la infectividad y virulencia, posiblemente relacionada con el grado de adaptación a un huésped particular.
- Exámenes Microscópicos: Los frotis y los cortes teñidos por el método de Giemsa u otras técnicas especiales como la técnica de Schiff con ácido pueden mostrar el microorganismo.

También existen otro tipo de microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos y son muy comunes en nuestro medio, como lo son las bacterias aeróbicas mesófilas.

k) Bacterias ***Heterotróficas***

Las bacterias heterotróficas (heterotrófas) se definen como aquellas bacterias que usan compuestos del carbono orgánico como fuente de energía para su crecimiento en contraposición con las bacterias autotróficas que utilizan los compuestos inorgánicos como fuente de energía y el CO₂ como fuente de carbono. Esta definición de bacteria heterótrofa es amplia e incluye tanto a las bacterias saprofíticas como a las patógenas. Por lo tanto, las bacterias que causan como las que no causan enfermedades son heterótrofas. ⁽¹⁾

l) Hongos

- Características Morfológicas de los Hongos.

Los mohos son hongos filamentosos multicelulares cuyo crecimiento en la superficie de los alimentos se suele reconocer fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso; la parte principal de su crecimiento suele tener un aspecto blanco, aunque puede tener colores distintos, color oscuro o color humo.

El talo o cuerpo vegetativo de los mohos esta formado por una masa de filamentos ramificados y entrelazados llamados hifas denominándose micelio al conjunto de estas hifas.

Las hifas pueden ser sumergidas; que son las que crecen dentro de los alimentos o aéreas que son las que crecen en la atmósfera existente por encima de los alimentos. ⁽¹⁶⁾

- Propiedades fisiológicas.

- Necesidad de Humedad:

En general en comparación con la mayoría de las levaduras y de las bacterias, la mayoría de los mohos necesitan menor cantidad de humedad disponible.

- Necesidad de Temperatura:

La mayoría de los mohos podrían considerarse, mesófilos, es decir, que son capaces de crecer bien a temperaturas normales. Para la mayoría de los mohos la temperatura óptima de crecimiento se encuentra alrededor de los 25 a 30 °C, aunque algunos crecen bien a temperaturas comprendidas entre los 35 y los 37°C o a temperaturas superiores. Algunos mohos son Psicrotófos, es decir, crecen bastante bien a temperaturas de refrigeración; y algunos son capaces de crecer lentamente a temperaturas inferiores a la de congelación. Unos pocos son termófilos, es decir, su temperatura óptima de crecimiento es elevada.

- Necesidad de oxígeno y de pH:

Los mohos son aeróbios, es decir, necesitan oxígeno para crecer; esto es cierto por lo menos en los mohos que crecen en la superficie de los alimentos. Casi todos los mohos son capaces de crecer dentro de un amplio

intervalo de valores de concentración de iones hidrógeno (pH comprendido entre 2 y 8.5), aunque la mayoría crecen mejor a pH ácido.

- Necesidades Nutritivas:

En general, los mohos son capaces de utilizar muchos tipos de alimentos, que van desde sencillos hasta complejos. La mayoría de los mohos poseen diversas enzimas hidrolíticas, y de aquí que algunos se cultiven por las amilasas, pectinasas, proteínasas y lipasas que contienen. ⁽⁷⁾

Los mohos son vegetales del Reino Myceteae. Carecen de raíces, de tallos de hojas y no poseen clorofila pertenecen a los Eumycetes, u hongos verdaderos y posteriormente se subdividen en subdivisiones, clases, ordenes, familias y géneros. ⁽¹⁶⁾

m) Levaduras:

El termino levadura se emplea de forma habitual, si bien su definición resulta difícil. En el sentido en el que aquí se emplea, se refiere a aquellos hongos que generalmente no son filamentosos, sino unicelulares y de forma ovoide u esferoide, y que se reproducen por gemación o por fisión.

Las levaduras que se encuentran en los alimentos pueden ser beneficiosas cuando intervienen en la elaboración de alimentos como el pan, la cerveza el vino, etc. y son perjudiciales cuando producen la alteración de algunos alimentos como en los zumos de frutas, en los jarabes, en las melazas, en la miel, en las carnes, en vino, etc.

- Caracteres Generales de las Levaduras

- Caracteres Morfológicos:

Forma y estructura. La forma de las levaduras puede ser desde esféricas a ovoide alimonada, piriforme cilíndrica, triangular, e incluso alargada, constituyendo un verdadero micelio o un falso micelio. También se diferencian en cuanto a su tamaño.⁽¹⁶⁾

- Caracteres de los Cultivos:

En la mayoría de los casos, el crecimiento en masa de las levaduras no resulta apropiado para identificar estos microorganismos. No obstante, el aspecto del crecimiento de los microorganismos tiene importancia cuando estos producen un moteado pigmentado en la superficie de los alimentos.

Las Levaduras son oxidativas, fermentativas, o bien su actividad metabólica es a la vez ambos tipos. En la superficie de un líquido, las levaduras oxidativas pueden crecer en forma de película, de velo o de espuma, y por ello se denominan levaduras formadoras de película.⁽¹⁶⁾

- Propiedades Fisiológicas

La mayoría de las levaduras necesitan mas humedad que los mohos.

El intervalo de temperatura de crecimiento de la mayoría de las levaduras es, en general parecido al de los mohos, con una temperatura óptima en torno a los 25 a 30 °C y una temperatura máxima en torno a los 35 a 47°C. Algunas especies son capaces de crecer a temperaturas de 0 °C o inferiores. Una reacción ácida del medio próxima a un pH de 4 a 4.5 estimula el crecimiento de la mayoría de las levadura, mientras que en

medios básicos no crecen bien a no ser que se hayan adaptado a los mismos.

Las levaduras crecen mejor en aerobiosis, aunque las especies de tipo fermentativo son capaces de crecer, aunque lentamente en anaeróbiosis.⁽¹⁶⁾

3.5 PAPEL QUE DESEMPEÑA EL ENTE NORMALIZADOR EN EL PAIS

En el país existe el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), que es una institución de derecho publico sin fines de lucro, de carácter autónomo descentralizado y es la autoridad superior en materia de política científica y tecnológica.

Esta institución cuenta con el departamento de normalización y certificación de la calidad; que desempeña las siguientes funciones:

1. Coordinar las actividades con otras instituciones del sector público, privado y científico, para la elaboración y adopción de normas técnicas nacionales.
2. Propone a la junta directiva a través del directorio ejecutivo las normas técnicas nacionales, para su aprobación por el ejecutivo por medio del ministerio de economía.
3. Velar por el cumplimiento de las normas técnicas nacionales.
4. Constituir los comités técnicos para el estudio, elaboración y modificaciones de las normas técnicas oficiales.
5. Acreditar y llevar registros de los laboratorios acreditados correspondientes al ejercicio de sus actividades.

6. Preparar y desarrollar programas para promover y difundir la importancia de la normalización, metrología, verificación y certificación de la calidad.
7. Darle trámite administrativo a las normas adoptadas por el consejo, enviándolos al Ministerio de Economía, para su aprobación, publicación en su caso.

En el área normativa se realiza la elaboración de normas salvadoreñas, que se divide en las siguientes categorías.

A. Normas Salvadoreña Obligatoria:

Este tipo de norma es la que se identifica con las iniciales NSO “Normas Salvadoreña Obligatoria”, seguida del número que le corresponda y de las dos últimas cifras del año de su aprobación y son obligatorias:

- a. Las que rigen el sistema internacional de unidades (SI);
- b. Las que se refieren a materiales, procedimiento, producto y servicios que puedan afectar la vida, la seguridad y la integridad de las personas, de otros organismos vivos y la relacionada con la protección del medio ambiente.
- c. Las que se establezcan por considerar el ejecutivo, a propuesta del consejo, que conviene a la economía o son de interés público.

Se les llama obligatorias porque como su nombre lo dice es obligación de cualquier organización que pretende ser reconocida legalmente, cumplir con este tipo de normas pues en este caso se vuelve ley y dicha organización puede ser sancionada sino se cumple con este tipo de norma.

B Normas Salvadoreñas Recomendadas:

Estas normas se identifican con las iniciales NSR “ Normas Salvadoreñas Recomendadas“, seguida del numero que le corresponde y de las dos ultimas cifras del año de su aprobación, y se referirán a las normas de materiales, procedimientos, productos y servicios no comprendidos en las normas obligatorias. Son optativas en las negociaciones privadas, pero tienen carácter obligatorio en todas las adquisiciones de bienes y servicios que efectúen las entidades estatales, autónomas o descentralizadas, en las cuales tanto el proveedor como los responsables de la compra, quedan obligados a su estricto cumplimiento y aplicación respectivamente.

En conclusión estos dos tipos de normas son las que rigen a las diferentes organizaciones que se dedican a la elaboración, y cuya aplicación pretende mejorar la calidad de procedimientos y de dichos productos, para hacerlos más competitivos en el mercado nacional y extranjero.

En base a una revisión exhaustiva de las normas NSR y NSO vigentes en el país se pudo obtener los límites microbianos para los siguientes alimentos Ver anexo # 5:

1. NSO 67.01.11:95 Helados y Mezclas de helados.
2. NSO 67.01.12.95 Mantequilla
3. NSO 67.01.08.95 Cremas Lácteos Pasteurizadas para consumo directo.
4. NSO 67.01.10:95 Yogurt

5. NSO 67.18.01.01 Bebidas no Carbonatadas sin alcohol.
6. NSO 67.01..01:96 Leche cruda de vaca.
7. NSO 67.01.02:96 Leche Pasteurizada.
8. NSO 67.01.04:95 Quesos no Madurados.
9. NSO 67.01.09:95 Productos de imitación de la crema de leche
10. NSO 67.03.01:01 Harinas, Harinas de trigo
11. NSO 67.03.01.03 Harinas, Harinas de trigo Mixtamizado
12. NSO 67.02.13:98 Carnes y Productos Cárnicos, Embutidos Crudos y cocidos
13. NSO 67.01.03:95 Quesos Madurados. Especificaciones ⁽⁷⁾.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLÓGICO

4. DISEÑO METODOLOGICO

La metodología se ha dividió en:

4.1 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

En esta parte se recopiló toda la información teórica relacionada con la elaboración de manuales, información sobre los microorganismos que más frecuentemente contaminan los alimentos así como los procedimientos de aislamiento e identificación, al mismo tiempo, se investigaron aspectos relacionados con la acreditación como requerimientos y lineamientos necesarios para su obtención; para ello fue necesaria la consulta de normas como la ISO/IEC 17025. También se recopiló información referente a las instrucciones de manejo del equipo utilizado en un laboratorio de análisis microbiológico para alimentos.

La bibliografía consultada se obtuvo de diferentes fuentes como:

- Biblioteca Central de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)
- Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM)
- Internet.

4.2 INVESTIGACIÓN DE CAMPO

En la investigación de campo se efectuó una entrevista a los laboratorios acreditados que llevan a cabo análisis microbiológicos de alimentos, con el fin de conocer la manera en que han trabajado para obtener y mantener la acreditación, para ello se utilizó un instrumento que contiene las preguntas que sirvieron para recabar la información (ver anexo No. 1)

Con la información recopilada se elaboraron

- a. Procedimientos Normalizados de Análisis microbiológicos de alimentos y diagramas de procedimientos de cada uno de los siguientes microorganismos
 - Aislamiento e identificación de ***Yersinia enterocolítica***
 - Aislamiento e identificación de ***Shigella sp***
 - Aislamiento e identificación de ***Listeria monocytogenes***
 - Aislamiento e identificación de ***Campylobacter jejuni***
 - Aislamiento e identificación de ***Vibrio vulnificus***
 - Recuento de Mohos y Levaduras
 - Aislamiento e identificación de ***Staphylococcus aureus***
 - Aislamiento e identificación de ***Clostridium botulinum***
 - Aislamiento e identificación de ***E. coli*** ,bacterias coliformes
 - Aislamiento e identificación de ***Salmonella sp***
 - Recuento e Identificación de ***Bacterias heterótrofas***

En ello se presentan las partes que propone la norma ISO/IEC 17025 y el procedimiento de análisis que debe utilizarse para aislar e identificar los microorganismos antes mencionados. Estos procedimientos se elaboraron en base al formato del anexo No. 2

b. Instrucciones de Manejo de Equipo.

En ellos se presentan los pasos a seguir para el uso correcto del equipo así como la limpieza que se recomienda para asegurar su adecuado mantenimiento.

Para la elaboración de las instrucciones de manejo de equipo se empleo el formato del anexo No 3.

CAPITULO V
LABORATORIOS ACREDITADOS QUE REALIZAN ANÁLISIS
MICROBIOLÓGICOS EN EL SALVADOR

5. LABORATORIOS ACREDITADOS QUE REALIZAN ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS EN EL SALVADOR

En un Laboratorio de análisis microbiológico es muy importante la confiabilidad de los resultados que se obtienen, es por eso que se vuelve indispensable trabajar de una forma organizada y documentado, permitiendo cumplir con requerimientos establecidos garantizando la calidad en los procesos de trabajo. Según información proporcionada por profesional encargado del proceso de acreditación en el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, existen actualmente en El Salvador cuatro Laboratorios microbiológicos de alimentos que se encuentran acreditados debido a que cumplen con la competencia técnica que este reconocimiento exige, estos son los siguiente:

- Laboratorio de Calidad Integral de la Fundación Salvadoreña para el Desarrollo Social, (FUSADES)
- Laboratorio de Especialidades Microbiológicas Industriales, (ESMI)
- Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos y Aguas del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, (MSPAS)
- Laboratorio Especializado en Control de Calidad, (LEEC)

Por lo tanto se ha recopilado información proporcionada por cada uno de ellos en la que se demuestra la forma en la que se encuentran trabajando actualmente para poder mantener la Acreditación.

5.1 LABORATORIO DE CALIDAD INTEGRAL DE LA FUNDACIÓN SALVADOREÑA PARA EL DESARROLLO SOCIAL (FUSADES)

DIRECCIÓN DE LABORATORIO: Boulevard Santa Elena Edificio Fusades, San Salvador.

PERSONA ENTREVISTADA: Lic. Ana Delmi de Melara

CARGO DENTRO DE LABORATORIO: Jefe de la Unidad de Microbiología de Alimentos y Aguas.

ANTECEDENTES

El Laboratorio de Calidad Integral FUSADES es un centro de investigación y servicios de laboratorio, caracterizado por la excelencia y la credibilidad, y cuyo objetivo es contribuir al desarrollo sostenible de El Salvador. Es un factor clave de apoyo para el sector agrícola, sector de alimentos y bebidas y en el área de medio ambiente.

Sus unidades cuentan con personal altamente calificado y su operación es de las más modernas de Centroamérica. Su infraestructura y sus equipos le permiten ofrecer servicios de la mejor calidad. Actualmente este centro de investigación cuenta con capacidad para realizar más de 500 tipos de análisis.

Desde el año 2001, es miembro activo de la Red Interamericana de Laboratorios de Análisis de Alimentos (RILAA) conformada por todos los países de América y el Caribe. El máximo ente acreditador del país CONACYT le confirió la acreditación en la norma NSR 45001, para realizar análisis

microbiológicos en aguas y alimentos. En 2003 logró nuevamente la acreditación para 12 análisis microbiológicos en alimentos, bebidas y aguas y amplió su alcance a 5 análisis físico químicos en aguas, bajo la norma ISO/IEC 17025:99 “Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y calibración”, norma actualmente vigente.

MISION

Ser el centro de investigación y servicio de laboratorio de FUSADES, que con excelencia y alta credibilidad, contribuya al desarrollo sostenible del país.

POLITICA DE CALIDAD

La Dirección y el personal del Laboratorio han adquirido el compromiso de brindar servicio de análisis y asistencia técnica de excelente calidad, contando para ello con normativa reconocida internacionalmente, recurso humano calificado, el cual conoce y aplica la documentación de calidad para dar cumplimiento a los requisitos de la norma ISO/IEC 17025, con el propósito de generar confianza en sus resultados y satisfacer a sus clientes

Los análisis que el laboratorio realiza son los siguientes:

- Análisis Microbiológicos:

Coliformes Totales	<i>Pseudomona sp</i>
Conteo Bacteriano Total	Recuento de Levaduras
<i>Clostridium perfringens</i>	Conteo Total Aeróbico Mesofílico
<i>Escherichia coli</i>	Conteo Total Aeróbico Termofílico
<i>Listeria monocytogenes</i>	Conteo Total Anaeróbico Mesofílico
Recuento de Hongos	Conteo Total Anaeróbico Termofílico
Recuento de Hongos y Levaduras	Enterobacterias
<i>Salmonella sp</i> sp, en 25g	Conteo Bacteriano Total en Ambiente
<i>Staphylococcus aureus</i>	Recuento de Hongos y Levaduras en Ambiente

- Métodos rápidos para alimentos:

Conteo de Coliformes Totales

Conteo de ***Escherichia coli***

Enterobacterias en Placa Petrifilm

5.2 LABORATORIO DE ESPECIALIDADES MICROBIOLÓGICAS

INDUSTRIALES (ESMI)

DIRECCIÓN DE LABORATORIO: 27 Calle poniente #944, Colonia Layco, San Salvador.

PERSONA ENTREVISTADA: Dra. Elvia Berenice Huevo de Hernández

CARGO DENTRO DE LABORATORIO: Directora General

NOTA:

No se proporcionó toda la información solicitada porque la persona entrevistada argumentó ser específica del laboratorio y por políticas del mismo la considera confidencial.

5.3 LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD DE ALIMENTOS Y AGUAS DEL MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL (MSPAS)

DIRECCIÓN DE LABORATORIO: Alameda Roosevelt, frente al Parque Cuscatlan, San Salvador.

PERSONA ENTREVISTADA: Lic. Reyna Jovel

CARGO DENTRO DE LABORATORIO: Coordinadora de Aseguramiento de la Calidad

ANTECEDENTES

A iniciativa de las autoridades de salud y con el apoyo de AID se crea el laboratorio de control de calidad de medicamentos en el año de 1987, con el propósito de asegurar que los medicamentos de la Red Nacional de Salud sean seguros, efectivos y cumplan con estándares de calidad aceptados internacionalmente.

En la actualidad el MSPAS mediante un sistema planificado de actividades realiza un control de calidad microbiológico a medicamentos, alimentos y aguas, cuyo propósito es asegurar la calidad de los productos. El sistema incluye por tanto todas las medidas para garantizar que los productos cumplan con las especificaciones establecidas de identidad, pureza, y otras características propias de cada producto

MISIÓN

El laboratorio de control de calidad tiene como misión realizar análisis microbiológicos y fisicoquímicos a medicamentos, alimentos, aguas, insumos médicos y productos biológicos nacionales y extranjeros para garantizar su calidad en beneficio de la población salvadoreña, para lo cual cuenta con instalaciones, equipo funcionando armónicamente, y con profesionales altamente calificados para verificar la calidad de dichos productos.

POLÍTICA DE CALIDAD

Proveer la más alta calidad en los servicios prestados, con las instalaciones, recursos y equipo funcionando armónicamente, y con profesionales altamente calificados y comprometidos, que ejecutan las tareas con mayor precisión, exactitud y mantenimiento de la confidencialidad de la información que se maneja utilizando métodos de análisis estándares oficiales y actualizados, todo con el propósito de garantizar que los productos adquiridos por el MSPAS sean los adecuados. El laboratorio esta comprometido a cumplir la normativa y así convertirse en un ente que goza de la confianza en los resultados emitidos, tanto a nivel nacional como internacional. La política de calidad esta en armonía con lo estipulado en la constitución de la Republica, el Código de Salud y la misión del Ministerio de Salud.

Los análisis que el laboratorio realiza son los siguientes:

- Análisis Microbiológicos:

Esterilidad

Límites Microbianos Aerobios Mesófilos

Hongos y Levaduras

Detección de Microorganismos patógenos

Prueba de endotoxinas

- Análisis Físico Químico:

Identificación del producto

Desintegración

Variación de peso volumen

Llenado mínimo

Disolución

pH

Cuantificación del principio activo.

5.4 LABORATORIOS ESPECIALIZADOS EN CONTROL DE CALIDAD (LECC)

DIRECCIÓN DE LABORATORIO: Calle san Antonio Abad, No. 1965, San Salvador.

PERSONA ENTREVISTADA: Lic. Rosalinda Montes

CARGO DENTRO DE LABORATORIO: Jefe del departamento de microbiología

ANTECEDENTES

Este laboratorio fue fundado en 1986 por la Dra. Elizabeth Banegas de Salazar. Comenzó como laboratorio de referencia en el control de calidad para la industria farmacéutica, siendo el primero de su naturaleza en el país. Ha mantenido un acelerado crecimiento mediante la adquisición de equipo de alta tecnología, aumento de su personal, mejora de sus instalaciones y diversificación de sus servicios.

Actualmente, el campo de actividad de LECC comprende la realización de análisis que comprueben la calidad y/o eficacia de medicamentos, aguas, cosméticos, alimentos, productos de origen natural y otros productos químicos, para lo cual realiza análisis microbiológicos y/o fisicoquímicos, según sea requerido por el cliente. Sin embargo su servicio va mas allá de hacer control de calidad, ya que es soporte técnico para la industria farmacéutica, alimentaria, cosmética agroindustrial y otras instituciones en la toma de decisiones e inicio de acciones dirigidas a mejorar la calidad, seguridad y eficacia de los productos

y servicios que ofrecen, adquieren y/o distribuyen. También cuenta con personal altamente calificado ya que el 30% de su equipo de trabajo posee estudios de postgrado, el 50% es personal profesional especializado y el 100% de su plantilla posee amplia experiencia e insuperable conocimiento en el área analítica.

MISIÓN

Somos soporte técnico en el control de calidad para nuestros clientes, ofreciéndoles un servicio de alta tecnología y con personal especializado, motivado y actualizado.

VISION

Ser reconocidos como un laboratorio de referencia, líder en su rama, no solo en Centroamérica sino en Norteamérica y el caribe, distinguido por su apego a estándares internacionales de calidad y con enfoque fundamental hacia el cliente

POLÍTICA DE CALIDAD

Ser facilitadores del proceso de mejoramiento continuo para nuestros clientes, personal, accionistas, proveedores y comunidad, mediante el propio mejoramiento continuo y la búsqueda de la excelencia

Análisis que el Laboratorio realiza:

- Análisis Microbiológico:

Recuento total de coniformes

Recuento total de microorganismos aerobios mesófilos

Recuento de ***Bacterias heterótrofas***

- Análisis Físicoquímicos

Demanda Química de Oxígeno en agua de vertidos Industriales

Sólidos totales disueltos en agua proveniente de vertidos Industriales

Prueba de Disolución.

5.5 ENTREVISTA A LABORATORIOS QUE SE ENCUENTRAN ACREDITADOS EN EL PAIS, Y QUE REALIZAN ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS EN ALIMENTOS.

Con el fin de obtener toda la información necesaria respecto a la acreditación de un Laboratorio y como les ha funcionado este reconocimiento, se elaboró una serie de preguntas recopiladas en un instrumento que permitió efectuar una entrevista a los profesionales encargados de cada uno de los Laboratorios y mediante el cual se ha podido constatar la forma de trabajo y demás beneficios que se pretenden con la Acreditación.

Se entrevistaron a profesionales Químicos Farmacéuticos encargados del área de Control de Calidad de los diferentes Laboratorios que realizan análisis microbiológicos de Alimentos y que actualmente cuentan con el reconocimiento de la Acreditación.(ver Anexo # 1)

De dicha entrevista se pudo recopilar información para determinar la funcionabilidad del proceso de acreditación y la forma de operación para el mantenimiento de dicho reconocimiento.

Los resultados de dicha entrevista se presentan a continuación:

1. ¿Cuánto tiempo le llevo efectuar el proceso de Acreditación?
2. ¿Cuánto tiempo tienen de contar con dicho reconocimiento?

Pregunta	FUSADES	ESMI	MSPAS	LECC
1.)	2 años	2 años	1½ año	1 año
2.)	4 años	1 año	8 meses	2 años

El proceso de acreditación lleva un tiempo entre uno a dos años; dependiendo de diversos factores como:

- a) Condiciones, instalaciones y equipo, pues si se hace necesario hacer mejoras en los mismos tomará más tiempo el proceso de acreditación.
- b) Conocimiento de la norma que exige la acreditación; NSR 172; Si el personal ya está documentado sobre ella.
- c) Recursos; Esfuerzo por parte del personal , así como el tiempo que tarde la elaboración de documentos, manuales de procedimientos.

Una vez obtenida la acreditación se vuelve un compromiso para el laboratorio, pues no solo se trata de conseguirla o alcanzarla sino de comprometerse a su mantenimiento.

3. ¿Qué procedimientos de análisis se encuentran acreditados?

	FUSADES	ESMI	MSPAS	LECC
RESPUESTA	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>E. coli</i> en alimentos - Hongos y levaduras en alimentos - Coliformes totales y fecales en alimentos - <i>Salmonella sp</i> en alimentos - Coliformes totales, y <i>E. coli</i> en aguas - Recuento total de bacterias aeróbicas mesófilas en agua. 	<ul style="list-style-type: none"> - Coliformes totales en agua - Recuento total de bacterias aeróbicas mesófilas - <i>E. coli</i> en alimentos - <i>Salmonella sp</i> en alimentos - <i>Staphylococcus aureus</i> en alimentos - Mohos y levaduras en alimentos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Determinación de hierro en alimentos - Cenizas en alimentos - Determinación de yodo en sal de mesa - Determinación de vitamina A en azúcar 	<ul style="list-style-type: none"> - Recuento total de coliformes

4. ¿En cuántas ocasiones les han realizado inspectorias desde que se aprobó la acreditación?

	FUSADES	ESMI	MSPAS	LECC
RESPUESTA	<ul style="list-style-type: none"> - Auditoria externa realizada por CONACYT, una vez al año - Auditoria interna una vez al año 	<ul style="list-style-type: none"> - Hasta la fecha no se les ha realizado auditoria 	<ul style="list-style-type: none"> - Hasta la fecha no se les ha realizado auditoria 	<ul style="list-style-type: none"> - Auditoria externa realizada por CONACYT, una vez al año - Auditoria interna cada seis meses

En el caso de ESMI y MSPAS aun no han cumplido el año de haberse acreditado, por lo tanto no se les ha efectuado ninguna auditoria externa por parte del ente acreditador.

5. ¿Por cuánto tiempo es válida la acreditación?

RESPUESTA	FUSADES	ESMI	MSPAS	LECC
	1 año	1 año	1 año	1 año

Cada año CONACYT realiza una reevaluación para verificar si el Laboratorio esta cumpliendo las exigencias y renovar así el contrato; si de lo contrario no cumple se retira la acreditación.

6. ¿Qué ventajas o desventajas han encontrado al obtener el reconocimiento de la Acreditación?

	FUSADES	ESMI	MSPAS	LECC
RESPUESTA	VENTAJAS			
	<ul style="list-style-type: none"> - Forma más organizada y controlada de realizar el trabajo. - Mejor trazabilidad (detectan con rapidez los errores en el proceso de análisis) - Mayor confiabilidad para los clientes 	<ul style="list-style-type: none"> - Se trabaja con orden - Es más práctico - Mayor confianza para el cliente por que se trabaja bajo un Sistema de Calidad 	<ul style="list-style-type: none"> - Mayor reproductibilidad en los análisis - Mayor orden - Menor retraso en la entrega de los resultados - Más confiabilidad 	<ul style="list-style-type: none"> - Mayor orden - Proporciona mayor credibilidad a los clientes - Mayor seguridad en los resultados de análisis
	DESVENTAJAS			
	<ul style="list-style-type: none"> - El tiempo que requiere para llevar los registros 	<ul style="list-style-type: none"> - Desde el punto de vista económico, resulta caro implementar el Sistema de Acreditación 	<ul style="list-style-type: none"> - Se tuvo tropiezo en un inicio al implementar el sistema por el cambio brusco en la forma de trabajo 	<ul style="list-style-type: none"> - La adaptación del personal al sistema de trabajo

Las ventajas de la acreditación se resumen en: mejor organización, mayor orden, optimización de recursos, rapidez y seguridad al realizar los análisis, dando como resultado mayor confidencialidad a los clientes, por el contrario las desventajas son casi inexistentes o solo se perciben durante un breve período de tiempo que a juicio de quienes cuentan con este reconocimiento es solo al inicio de la implementación de dicho sistema, en el aspecto de adaptación a la nueva forma de trabajo y por otra parte el costo que requiere obtenerlo.

7. ¿A qué tipo de instituciones les efectúan dichos análisis?

	FUSADES	ESMI	MSPAS	LECC
RESPUESTA	Clientes particulares y gubernamentales	Todo tipo de empresas; particulares y gubernamentales; incluyendo restaurantes	Toda industria de alimentos nacionales y privados y que quieren registrarse.	Fabricas de alimentos MOLSA, MASECA., BIMBO , LIPRAC.

Los cuatro laboratorios se encuentran capacitados para atender toda clase de empresas lo que demuestra que si poseen todos los recursos necesarios para efectuar cualquier clase de análisis según las exigencias del solicitante.

8. ¿Poseen un diagrama de flujo de manejo de muestra cuando ésta llega al laboratorio?

	FUSADES	ESMI	MSPAS	LECC
RESPUESTA	Sí	No como diagrama de flujo; pero sí como procedimiento descrito	No como diagrama de flujo; pero sí como procedimiento descrito	Sí

Es independiente que cada laboratorio establezca un diagrama de flujo de Procedimientos; ya que la norma de acreditación no lo exige, Pero como políticas propias de la institución, tanto LECC como FUSADES para un mayor control del proceso que se lleva a cabo, si se han establecido un diagrama de flujo, no así ESMI y MSPAS que han establecido procedimientos descritos, por no considerar necesarios los diagramas.

9. ¿Cuál es la metodología que utilizan para realizar el muestreo?

RESPUESTA	FUSADES	ESMI	MSPAS	LECC
	Hay un departamento de muestreo; que posee un manual.	No poseen metodología de muestreo; es el cliente el que proporciona la muestra.	El muestreo lo lleva a cabo la gerencia ambiental (Inspectores)	No muestrean, el cliente proporciona la muestra.

En el caso de FUSADES hay un departamento de muestreo que es el que maneja los métodos; así como en el MSPAS es la gerencia ambiental, la encargada de realizarlo. En ESMI y LECC no se efectúa muestreo; pues la muestras ingresan a través del cliente; ellos recomiendan por lo menos de 3 a 5 muestras representativas por lote

10. ¿Con qué tipo de equipo cuentan para realizar los análisis?

RESPUESTA	FUSADES	ESMI	MSPAS	LECC
	<ul style="list-style-type: none"> - Balanzas - Estufas - Incubadoras - Baños maria - pHmetro - Cámaras de flujo laminar - Cuenta colonias - Microscopios - Refrijadoras 	<ul style="list-style-type: none"> - Autoclave - Incubadoras - Baños maria - pHmetro - Cuenta colonias - Microscopios - Refrigeradoras - Cabinas de flujo laminar - Homogenizadores - Jarra de anaerobiosis 	<ul style="list-style-type: none"> - Espectrofotómetro - Stomacher - Licuadoras con vasos de acero inoxidable - Cuenta colonias - Camara de luz uv - Incubadoras - Autoclaves - Baño maria - pHmetro 	<ul style="list-style-type: none"> - Cabina de Bioseguridad - Incubadoras - Cuenta colonias - Baños maria - Autoclaves - Homogenizador digital - Balanzas - HPLC - Espectrofotómetro

Como se puede observar cada uno de los Laboratorios cuenta con el equipo básico para realizar los análisis, aunque unos con mayor cantidad de equipo y

un poco mas sofisticado que otro, lo que le permite prestar mayor diversidad de análisis, lo importante es que la acreditación da la seguridad que todo Laboratorio que posea dicho reconocimiento cuenten con todo lo necesario para realizar los análisis, proporcionando resultados altamente confiables que aquellos que no cuenten con dicho reconocimiento

11. ¿Cuentan con un manual de Instrucciones de manejo del equipo que utilizan para realizar los análisis?

RESPUESTA	FUSADES	ESMI	MSPAS	LECC
	Sí	Si	Si	Si

Todos los laboratorios cuentan con manuales de Instrucciones de manejo de equipo, dando la pauta de la preocupación por mantener el buen funcionamiento del mismo, ya que en este se encuentra detallado la forma correcta de utilizarlos, así como las especificaciones de los equipos, fechas de calibración, etc. garantizando un funcionamiento óptimo a la hora de realizar los análisis y por consiguiente mayor seguridad en la obtención de resultados. FUSADES, MSPAS Y LECC; además del manual de instrucciones por cada instrumento llevan también una hoja de vida en la que se detalla: el nombre del equipo; la marca del equipo; código proveedor; fecha en que se ha realizado la última calibración y fecha en que debe efectuarse la siguiente; fecha de

limpieza y mantenimiento del equipo; así como también el control de uso del equipo en el que se registra el nombre del personal que utiliza el equipo; fecha y hora de uso.

12. ¿A qué tipo de alimentos realiza los análisis?

	FUSADES	ESMI	MSPAS	LECC
RESPUESTA	Todo tipo de alimentos, materia prima, producto terminado y alimento crudo	Materia prima, alimentos cocinados, alimentos procesados	Todo tipo de alimentos	Materia prima, alimentos crudos, productos terminados, refrescos.

13. ¿Qué metodología analítica básica utilizan para realizar los análisis?

	FUSADES	ESMI	MSPAS	LECC
RESPUESTA	<ul style="list-style-type: none"> - Estándar Método de aguas y aguas de desecho, edición, (20 ed.) - BAM 1995 - Compendio de Análisis Microbiológico 	<ul style="list-style-type: none"> - BAM, para Alimentos - Farmacopea, para Medicamentos - Estándar métodos - AOAC 	<ul style="list-style-type: none"> - AOAC - Estándar métodos, (NMP) - Vertido en Placa - Pruebas Bioquímicas) 	<ul style="list-style-type: none"> - AOAC, - Estándar métodos, USP, (Tritimétricos - Cromatografía de Capa fina - Espectrofotometría - Placa Vertida - Filtración por Membrana - NMP)

Los cuatro laboratorios trabajan básicamente con las mismas metodologías Oficiales como el Manual de Análisis Bacteriológico (BAM), la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC), Stándar Method y las Farmacopeas, todo dependiendo del tipo de producto a analizar, dando mayor credibilidad y confiabilidad en los resultados de los análisis.

Se puede ver que en ESMI y MSPAS se realizan análisis a diferentes tipos de Microorganismo y no se limitan únicamente a aquellos Microorganismo cuyos procedimientos están acreditados.

14. ¿Para qué tipo de Microorganismo realizan los análisis?

	FUSADES	ESMI	MSPAS	LECC
RESPUESTA	Shaphylococcus E.Coli Coliformes totales y fecales. Salmonella sp. Recuento total de bacterias aeróbicas Mesófilas.	Enterobacterias en general. Listeria Monocitogenas. Clostridium perfringes. Pseudomona en agua. Shigella sp. Vibrio cholerae.	Salmonella sp. Staphylococcus aureus. Pseudomona. Mohos y levaduras. Coliformes totales fecales, y E. coli. Clostridium perfringes.	Coliformes Totales.

15. ¿Poseen Organismos de Prueba o Cepario (Bacterioteca)?

	FUSADES	ESMI	MSPAS	LECC
RESPUESTA	Si, son almacenados a 4°C, existe un protocolo para resiembra, las cepas con las que se cuentan son: Staphylococcus Salmonella sp E. coli Listeria monocytogenes Pseudomonas.	Si, Cepas de referencias, Bacterias como: <i>Proteus</i> E. coli Staphylococcus Salmonella sp Listeria monocytogenes Enterobacter Mohos, como: <i>Sacharomices,</i> Aspergillus niger	Mohos y Levaduras, E. coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas, Salmonella sp	Si, se tienen en una refrigeradora a temperatura de 8-10 °C: Staphylococcus aureus, Pseudomonas, Salmonella sp, E. coli, Bacilo subtilis

El mismo hecho de contar con una bacterioteca le da mayor credibilidad al trabajo que realizan, indicando que llevan a la par controles positivos en los análisis evitando resultado falsos positivos así como perdida de tiempo,

recursos, etc., debido a que no necesitan solicitar microorganismos de prueba a otras instituciones o empresas que se dedican a la producción de estos, y siempre brindándoles un mantenimiento adecuado para su vida útil.

16. ¿En que forma llevan el registro de datos de los análisis que realizan?

	FUSADES	ESMI	MSPAS	LECC
RESPUESTA	<p>Los datos se registran de dos formas:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. En hojas de trabajo y en hojas específicas para cada metodología 2. En copia electrónica 	<p>Los datos son registrados en:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1- Hoja electrónica 2- Impresos en papel 3- Disket 	<p>Se registran en papel y en medio electrónico</p>	<p>Se archivan en medio electrónico y en papel</p>

Como toda empresa competitiva y por requerimientos de la norma de acreditación NSR 17025 se llevan registros de datos y documentos, todos los Laboratorios llevan sus datos de análisis de forma eficiente, en medio electrónico y a papel, asegurando un acceso más rápido y a la vez una forma más segura de almacenarlos, por cualquier duda queja o reclamo de los clientes tienen el respaldo de contar con todos sus procesos documentados dando mayor seguridad al analista y a sus clientes.

17. ¿Cuentan con una bodega para almacenar medios de cultivos y reactivos?,
¿Cuales son las condiciones de almacenamiento?

	FUSADES	ESMI	MSPAS	LECC
RESPUESTA	Sí, se mantiene en refrigeración los que lo necesitan, los demás a temperatura ambiente	Sí, se mantienen a las condiciones especificadas por el fabricante, hasta temperaturas de hasta 25°C	Sí, cuentan con dos bodegas, una para reactivos y la otra para medios de cultivos, las condiciones de acuerdo al fabricante	Sí, las condiciones de acuerdo al fabricante

El contar con un espacio exclusivo para almacenar medios de cultivos y reactivos demuestra una adecuada distribución de las instalaciones y una mejor organización debido a que se evita posible contaminación de los medios de cultivos y reactivos con otros productos utilizados en los análisis, al mismo tiempo el hecho de proporcionarles las condiciones adecuadas que cada uno requiere asegura el óptimo funcionamiento o eficacia durante el período de vida útil de los mismos, siendo este otro aspecto importante para obtener la acreditación.

18. ¿Efectúan pruebas de reactividad

	FUSADES	ESMI	MSPAS	LECC
RESPUESTA	Si, cada vez que se preparan los medios se evalúan: Esterilidad, Promoción de crecimiento y controles bioquímicos	Si, se valoran los medios de cultivos para verificar si responden a los microorganismos a los que están destinados	Si, se les hacen controles positivos y negativos y un control de calidad analítico	Si, efectúan pruebas de Promoción de crecimiento, media vez vencidos no se utilizan

Realizar pruebas verificando la efectividad de los medios de cultivos y reactivos proporciona mayor fiabilidad en la obtención de resultados de análisis, debido a que existe una mejor vigilancia de cada una de las materias primas que se utilizan asegurando que cada una es la adecuada para el análisis al que se aplica.

19. ¿Tiene o no sus áreas analíticas separadas o identificadas?

	FUSADES	ESMI	MSPAS	LECC
RESPUESTA	Si, las áreas están distribuidas en: <ul style="list-style-type: none"> - Preparación de medios de cultivos - Cristalería - Area estéril - Area de almacenamiento de medios de cultivos deshidratados y medios de cultivos preparados - Agua y Alimentos - Area de incubación - Area con baños 	Si	Si	Si, poseen: <ul style="list-style-type: none"> - Areas de preparación donde se encuentran cristalerías y medios de cultivos - Area de Alimentos - Area de potencia de Antibióticos - Area de límites microbianos - Area de esterilidad

La identificación de las áreas demuestra que la infraestructura es la apropiada y que esta distribuida de tal manera que se evita contaminación cruzada. Ya que cada área tiene un uso exclusivo dando seguridad y calidad en cada una de las operaciones que realizan.

20. ¿Poseen Manual de seguridad?

	FUSADES	ESMI	MSPAS	LECC
RESPUESTA	Si, Poseen un manual de seguridad industrial	Si, poseen disposiciones en caso de emergencia	Si poseen Manual de seguridad, además realizan auditorias para verificar si se están cumpliendo las medidas de seguridad	Si, poseen manual de seguridad, contando con duchas y extinguidores propios de cada área

Al contar con manuales de seguridad demuestran que han considerado todos los aspectos no solo con respecto a los clientes, si no también toman en cuenta la seguridad y bienestar del personal y el mantenimiento adecuado de las instalaciones del Laboratorio, cumpliendo de esta manera con un aspecto importante para la Acreditación.

CAPITULO VI
GENERALIDADES DE LA ACREDITACIÓN

6. GENERALIDADES DE LA ACREDITACION

Definición de Acreditación:

Es un reconocimiento legal que otorga el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología(CONACYT), a todo laboratorio de calibración y ensayo que cumple con la Norma ISO/IEC 17025, en la que se plantean los requerimientos necesarios, para demostrar que este opera bajo un sistema de calidad, que es técnicamente competente y es capaz de generar resultados técnicamente validados.

De igual manera queremos hacer de su conocimiento algunos objetivos específicos comunes a todos los sistemas de acreditación existentes, entre estos tenemos:

1. Asegurar la validez de los datos de las pruebas
2. Promover la aceptación de los datos de las pruebas por los usuarios de los servicios de los laboratorios, de forma que los datos producidos por un laboratorio sean aceptados por otro sin hacerles pruebas posteriores
3. Facilitar el comercio internacional por medio de la aceptación de los datos de pruebas de los laboratorios acreditados
4. Hacer un uso más eficiente de las instalaciones de prueba dentro de un país coordinando las capacidades existentes.
5. Aumentar la credibilidad de más laboratorios.
6. Dar una categoría adicional a los laboratorios competentes
7. Promover buenas prácticas de pruebas.

8. Mejorar los métodos de las pruebas proporcionando retroinformación a los productores de estándares con respecto a lo adecuado de los métodos de pruebas.
9. Proporcionar información técnica y de otro tipo a los laboratorios acreditados.

Entre las ventajas que ofrece un sistema de acreditación se encuentran:

1. Fomenta la confianza
2. Elimina las barreras no tarifarias del intercambio comercial
3. Fomenta la cooperación entre laboratorios
4. Fomenta el intercambio de información
5. Sirve para igualar los procedimientos con las normas
6. Fomenta la planificación estratégica
7. Fomenta el intercambio con otros países y la aceptación internacional⁽⁵⁾

6.1 ORGANISMO NACIONAL DE ACREDITACION

En la actualidad debido al avance en las diferentes áreas, sean estas tecnológicas, científicas, comerciales, el país se ha visto en la necesidad de crear un organismo que permita implementar nuevos sistemas para mejorar la calidad del trabajo, y poder así, igualar condiciones y capacidades, para poder competir en el mercado nacional e internacional; es por ello que surge el Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT). Este es el organismo de Normalización de la Republica de El Salvador que representa al país ante las

organizaciones internacionales y regionales de normalización. Esta organización se encarga entre otros aspectos de regular los procedimientos relativos a la acreditación de laboratorios de calibración y análisis a través de su departamento de Normalización metrología y Certificación de la calidad (NMCC).

Este procedimiento involucra a la vez a la dirección Ejecutiva, asesoría legal y a la junta directiva y mas específicamente a la unidad de acreditación, que es la encargada de verificar las auditorias que se realizan a los laboratorios y llevar toda la documentación relacionada con este tema.

El CONACYT análogamente se rige en asuntos de acreditación por el reglamento de acreditación de laboratorios de ensayo y análisis de acuerdo a este reglamento la acreditación es otorgada a cualquier laboratorio oficial o privado que se dedique a la realización de pruebas, ensayos y mediciones científicas, investigativas, medicas, industriales o de cualquier otra índole que involucran ensayo y calibración; siendo este el campo de aplicación de la norma ISO/IEC 17025.

Esta norma es la que CONACYT toma de base para realizar las evaluaciones en los laboratorios que pretenden ser acreditados.

A continuación se detallan los requerimientos con los que un laboratorio debe contar para obtener dicho reconocimiento ⁽⁶⁾.

6.2 REQUERIMIENTOS CON LOS QUE UN LABORATORIO DEBE CONTAR PARA OBTENER LA ACREDITACION (ISO/IEC 17025.)

REQUERIMIENTOS DE GESTION (ADMINISTRACIÓN)

ORGANIZACIÓN.

De acuerdo a lo establecido por la norma esta debe ser una entidad que pueda ser sujeta de responsabilidad legal, sus actividades de calibración y prueba deben ser llevadas a cabo de manera que cumpla con las cláusulas en ella descrita, y satisfacer las necesidades del cliente, las regulaciones de las autoridades o de las organizaciones que proveen reconocimiento.

Si el laboratorio es parte de una organización que realiza actividades aparte de las de prueba y calibración, las responsabilidades del personal clave que esta involucrado o influye en las actividades de calibración y prueba del laboratorio deben estar bien definidas, para identificar potenciales conflictos de interés. Por otra parte hay una serie de requerimientos propios de la organización del laboratorio, los cuales tiene que cumplir, estas son las que se presentan a continuación.

- Tener personal técnico y administrativo con la autoridad y recursos necesarios para llevar a cabo sus tareas e identificar la ocurrencia de desviaciones.
- Tener políticas y procedimientos para asegurar la protección de la información confidencial y derechos de propiedad de sus clientes,

incluyendo procedimientos para proteger el almacenamiento y transmisión electrónica de resultados.

- Tener políticas y procedimientos para evitar participación en cualquier actividad que pudiera disminuir la confianza en su competencia, imparcialidad, juicio o integridad operacional.
- Definir la estructura de la organización y dirección del laboratorio; su lugar en cualquier organización matriz y las relaciones entre el manejo de la calidad, operaciones técnicas y servicios de soporte
- Especificar la responsabilidad, autoridad e interrelaciones de todo el personal que maneja, desempeña o verifica el trabajo que afecta la calidad de las pruebas y/o calibraciones.
- Proveer adecuada supervisión del personal de calibración y prueba, incluyendo entrenamiento por parte de personas familiarizadas con los métodos y procedimientos, Propósito de cada prueba o calibración, y con la interpretación de los resultados de las pruebas y calibraciones
- Tener dirección técnica que tenga responsabilidad total por las operaciones técnicas y la provisión de recursos necesarios para asegurar la calidad requerida en las operaciones del laboratorio.
- Designar a un miembro del grupo de trabajo como Director de calidad (o como sea que quiera llamarlo) que, a pesar de otras tareas y responsabilidades, tendrá responsabilidades definidas y la autoridad para asegurar que el sistema de calidad sea implementado y seguido todo el

tiempo, el director de calidad tendrá acceso directo a los mas altos niveles de dirección en las que se toman las decisiones de políticas y recursos del laboratorio.

- Designar suplentes para el personal directivo clave (solo cuando sea necesario)

SISTEMA DE CALIDAD

Es la estructura organizacional, procedimientos, procesos y recursos necesarios para implementar la calidad, es decir que es la forma como una organización va a realizar el trabajo en cumplimiento con la norma para asegurar calidad en cada una de las operaciones. Por tanto se debe cumplir con lo siguiente:

- El laboratorio establecerá implementara y mantendrá un sistema de calidad apropiado para el rango de sus actividades, igualmente documentara sus políticas, sistemas, programas, procedimientos e instrucciones en la extensión necesaria para asegurar la calidad de los resultados de calibración y prueba. La documentación del sistema será comunicada a, entendida por, disponible para, e implementada por el personal apropiado.
- Los objetivos y políticas del sistema de calidad del laboratorio serán definidos en un manual de calidad. Los objetivos generales, se documentarán en un instructivo de política de calidad. El instructivo de política de calidad debe ser emitido bajo la autoridad del jefe ejecutivo. Este

instructivo debe incluir lo que la norma 17025 especifica en su numeral 4.2.2.

CONTROL DE DOCUMENTOS

Es necesario un sistema en el que se establezca y mantenga los procedimientos para controlar todos los documentos que forman parte de su sistema de calidad internamente generados o de fuentes externas, como regulaciones, normas, otros documentos normativos, métodos de prueba y calibración, etc.

El personal encargado de la documentación realizara la aprobación y emisión de documentos que este de acuerdo con las actividades que se realizan y que estos estén vigentes y no obsoletos o inapropiados y se encuentren disponibles para consultarlos. Además los cambios que se realicen en los documentos serán revisados y aprobados por el mismo personal que reviso los originales, a menos que se asigne a otro que tenga conocimiento de ellos.

REVISIÓN DE PEDIDOS OFERTAS Y CONTRATOS

Es necesario la revisión de pedidos para satisfacer las necesidades o peticiones de sus clientes, y servirles de la mejor manera posible de la misma forma con las ofertas y contratos, que estos no interfieran con el cumplimiento de la norma de calidad, por lo que es necesario contar con procedimientos y políticas de revisión que aseguren la calidad de los resultados.

SUBCONTRATACIÓN DE CALIBRACIONES Y PRUEBAS

Este es aplicable en el caso que el laboratorio requiera de dichos servicios; si este fuera el caso el laboratorio antes de solicitar dicho servicio debe estar seguro que este laboratorio cumpla con los requerimientos de la norma, y además el cliente debe estar de acuerdo de dicha subcontratación

ADQUISICIÓN DE SERVICIOS Y SUMINISTROS

para llevar a cabo dicho procedimiento el laboratorio debe contar con un método de evaluación de todos los suministros que pretenden ser emitidos al laboratorio, para determinar la calidad de los mismos y asegurar así, la calidad de los resultados de las pruebas que este realiza, llevando un control de los proveedores que satisfacen sus expectativas, y hacer mas fácil la elección de los productos a adquirir.

SERVICIO AL CLIENTE

El laboratorio debe de contar con políticas y procedimientos que den solución a todas las inquietudes que estos tengan respectos a las pruebas que solicitan, así como asegurarles una completa confidencialidad de los resultados de análisis que se les haya realizado.

QUEJAS

Además debe contar con políticas y procedimientos que se apliquen a las quejas recibidas de parte de los clientes, que aseguren soluciones, y mejorar los aspectos en lo que hayan habido discrepancias con los clientes.

CONTROL DE LAS NO CONFORMIDADES EN EL TRABAJO DE PRUEBA Y CALIBRACION

El laboratorio debe contar con políticas y procedimientos encaminados a aplicarse en el caso que se detecte una inconformidad en los resultados de los análisis, como por ejemplo el incumplimiento de alguno de los requerimientos con lo que se cuenta; dando paso al siguiente procedimiento.

ACCIONES CORRECTIVAS

Es necesario antes de implementar la acción que nos encamine a corregir las no conformidades, hacer un estudio minucioso que nos ayude a determinar la causa de la no conformidad, y hacer mas fácil la elección de la acción correctiva a implementar; igualmente se debe monitorear las acciones correctivas, para estar seguro que fue la elección apropiada, que nos solucionó el problema.

ACCIONES PREVENTIVAS

Luego de haberle dado solución a las no conformidades es necesario implementar acciones que prevengan o eviten la ocurrencia de dicho problema.

CONTROL DE REGISTROS

Se debe llevar un registro de todos los procedimientos u operaciones que el laboratorio realice, y que tenga que ver con el Sistema de Calidad, el cual debe ser confidencial para el laboratorio; en el que tendrá acceso solo personal autorizado.

AUDITORIAS INTERNAS

Estas deben ser realizadas periódicamente por personal profesional calificado, para auditar dichas áreas asignadas que ayude a mantener el sistema de calidad apropiado.

REVISIONES ADMINISTRATIVAS

Se refiere a que la administración ejecutiva del laboratorio deberá periódicamente conducir una revisión del sistema de calidad del laboratorio y de las actividades de prueba y calibración, para asegurar la continuidad de su efectividad y ajuste.

Hasta ahora solo hemos descrito un poco referente a los requerimientos de gestión, pero hay una parte que es muy importante y es la que se presenta a continuación.

REQUERIMIENTOS TÉCNICOS

Para toda organización que se encarga de llevar a cabo calibraciones y prueba, este es un punto a tener en consideración debido a que de estos dependen en gran parte la fidelidad de los resultados de los análisis que se realicen, por ello se tratara de explicar brevemente cada uno de estos.

PERSONAL

Este debe ser personal capacitado y calificado para cada una de las actividades o labores que estén bajo su responsabilidad, de tal forma que no sea él una causa de error directa de los resultados obtenidos, asegurando que este trabajo acorde con el sistema de calidad del laboratorio, aplicando las buenas practicas de laboratorio.

INSTALACIONES Y CONDICIONES AMBIENTALES

El laboratorio debe contar con instalaciones que faciliten la correcta ejecución de las pruebas y calibraciones, es decir que deben cumplir con las Buenas Practicas de Manufactura, en el punto en como deben estar distribuidas cada una de las áreas con las que este cuente evitando así, contaminación cruzado u otro inconveniente que pueda afectar la calidad de los resultados. Igualmente se realizará un monitoreo y control para determinar que las condiciones ambientales sean las requeridas y no poner en peligro los resultados de las pruebas y calibraciones.

ENSAYO Y METODOS DE CALIBRACIÓN Y VALIDACIÓN DE METODOS

El laboratorio usará métodos y procedimientos apropiados para todas las pruebas y/o calibraciones dentro de su alcance. Estos incluyen el muestreo, manejo, transporte, almacenamiento, preparaciones de muestras o artículos a ser ensayados y/o calibrados.

El laboratorio tendrá instrucciones para el uso y operación de todo el equipo relevante, el manejo y preparación de artículos que serán probados y/o calibrados donde la ausencia de algunas instrucciones pueden poner en peligro los resultados de los ensayos y/o calibraciones.

En esta parte es muy importante la selección del método a utilizar ya que este debe ser el que cumpla con las necesidades del cliente, y al mismo tiempo con los requerimientos de normas nacionales, regionales, internacionales, en el caso que sean métodos no estandarizados, estas deben de contar con su respectiva validación antes de su uso.

Esta validación no es mas que la confirmación por verificación y la provisión de la evidencia objetiva de que los requerimientos particulares para un uso específico planeado son cumplidos, en otras palabras quiere decir, que al realizar un análisis con un muestreo especificado bajo buenas practicas de laboratorio y siguiendo fielmente el procedimiento establecido. El resultado del análisis debe ser el mismo las veces que se realice y con cualquier laboratorio que se ponga en practica.

Sin embargo, es de esperar que en algunos casos el resultado tenga cierto grado de variabilidad, pero este debe estar dentro de un rango establecido, por lo que es necesario considerar ciertos aspectos que se mencionan en la norma 17025 como lo es la estimación de la incertidumbre de la medición llevando siempre un control de los datos obtenidos en dicho proceso de validación utilizando el equipo y procedimientos o programas adecuados para cada uno de los cálculos que se requieren para la validación.

EQUIPO

El laboratorio debe estar equipado adecuadamente con el rango de sus actividades, para facilitar la realización de los análisis este equipo debe ser capaz de alcanzar la precisión requerida para la correcta ejecución de las pruebas y calibraciones, y se debe contar con personal capacitado para operar dicho equipo de igual forma con todas las instrucciones actualizadas en su uso, mantenimiento, operación del mismo y una serie de requerimientos que se especifican en la norma 17025, por hacer mención "Medición de la trazabilidad", así también se tendrá un programa establecido y procedimiento para la calibración de equipo, procedimientos para el manejo seguro, transporte, almacenamiento, uso y mantenimiento planificado del equipo de medición para asegurar su apropiado funcionamiento.

MUESTREO

En el caso que el laboratorio cuente con un plan de muestreo este debe estar basado en métodos estadísticos apropiados y tendrá procedimientos para el registro de datos relevantes y operaciones relativas al muestreo. Estos registros incluirán el procedimiento de muestreo utilizado, la identificación de la persona que toma la muestra, etc.

MANEJO Y TRANSPORTE DE LOS OBJETOS DE PRUEBA Y CALIBRACIÓN.

Así también el laboratorio debe tener procedimientos para el transporte recepción, manejo, protección, almacenamiento retención de los objetos de prueba y calibración; incluyendo todas las provisiones necesarias para proteger la integridad de la prueba o calibración; evitando de esta manera confusiones en las muestras y para proteger los intereses del laboratorio y el cliente.

ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS DE PRUEBA Y CALIBRACIÓN.

El laboratorio tendrá procedimientos de control de calidad para monitorear la validez de las pruebas y calibraciones tomadas.

REPORTE DE RESULTADOS

Los resultados de cada prueba o calibración realizadas por el laboratorio, serán reportadas de forma exacta, clara y objetivamente y deberán incluir toda la

información requerida por el cliente y necesaria para la interpretación de los resultados, de igual forma se debe contar con reportes de prueba y certificados de calibración el cual debe contener lo especificado en la norma en su numeral 5.10.2 , 5.10.3 y 5.10.4 y una serie de especificaciones propias del laboratorio que siempre debe estar regido bajo el cumplimiento de la norma 17025 ^(5.)

6.3 REGLAMENTO DE ACREDITACION DE LABORATORIOS DE ENSAYO Y ANÁLISIS

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, cuenta con el presente reglamento; para llevar a cabo la acreditación de laboratorios de ensayo y análisis el cual decreta lo siguiente:

En el Art. 1. Declara que el objetivo de este reglamento es establecer el procedimiento para la acreditación de laboratorios de ensayo y análisis.

Por lo que se denomina al CONACYT, específicamente al Departamento de Normalización, Metrología y Certificación de la calidad para los efectos del mismo.

Art. 2. De toda solicitud que se presente al “CONACYT” se llevará un expediente de los trámites que se sigan para resolverla; además, las resoluciones que se dicten en el curso de estos, solo producirán efectos luego de notificadas a las partes interesadas.

Las transcripciones, extractos y certificaciones de las resoluciones, documentos o partes de los mismos que conforman el expediente, extendidas por el Director

Ejecutivo y con el sello del "CONACYT", tendrá reconocimiento legal ante terceros.

Todos los gastos en que se incurra en la tramitación de las solicitudes, realización de controles y/o auditorias; muestreos, ensayos, análisis y otros actos, serán por cuenta del solicitante.

DE LA ACREDITACIÓN DE LABORATORIOS, OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN,

Art. 3. Cualquier laboratorio oficial o privado, que se dedique a la realización de pruebas, ensayos, análisis y mediciones científicas, investigativas, medicas industriales e ingenieriles o de cualquier otra índole, solicitara al CONACYT, que lo acredite para resultados e informes de análisis de bienes y servicios destinados al mercado nacional o internacional.

Para cada solicitud se llevará un expediente por separado en el que se consignarán todas las actualizaciones previas a la aprobación de la acreditación o denegación de la misma.

ALCANCE DE LA ACREDITACIÓN

Art. 4. El alcance de una acreditación se definirá sin ambigüedad, con referencia a uno o a varios ensayos; los métodos que se utilicen en la realización de un ensayo específico para el cual se ha otorgado la acreditación,

deberán estar respaldados por normas o por métodos alternativos debidamente validados.

La acreditación se otorgara únicamente a los laboratorios que cumplan con todos los requisitos que para el efecto haya establecido el CONACYT.

SOLICITUD PARA LA ACREDITACIÓN

Art. 5. El propietario del laboratorio o su representante legalmente autorizado para tal efecto, deberá firmar la solicitud, en la cual deben especificar los siguientes requisitos:

- a) El alcance claramente definido de la acreditación deseada;
- b) El conocimiento exacto de la forma en que funciona el sistema de acreditación;
- c) La aceptación de cumplir con el procedimiento de acreditación, en especial, lo referente a recibir el equipo evaluador y pagar los gastos que se generen, independientemente de los resultados de la evaluación. Además si se concede la acreditación, aceptar la vigilancia subsiguiente con todos los derechos y obligaciones.

Se entregara al laboratorio solicitante, una descripción detallada del procedimiento de acreditación, y un documento en el cual se consignen los derechos y obligaciones de los laboratorios acreditados.

PROCESO DE ACREDITACIÓN

Art. 6. El proceso de acreditación comprende entre otras, las actividades siguientes:

- a) Recopilación de información requerida para la evaluación del laboratorio solicitante, de preferencia mediante la realización de preauditorias.
- b) Designación de tres o más evaluadores calificados que realizarán la evaluación;
- c) Evaluación en el lugar sede del laboratorio solicitante;
- d) Revisión del material de evaluación reunido, incluyendo la información proveniente de los ensayos intra e Inter laboratorios (si han sido requeridos)
- e) Decisión de otorgar o denegar, con condiciones o sin ellas, la acreditación, y la definición del alcance de la misma en base al informe del grupo evaluador.

INFORMACIÓN PARA LA EVALUACIÓN

Art. 7. El laboratorio solicitante suministrará la información siguiente:

- a) Datos generales del laboratorio solicitante, tales como: nombre y dirección de la empresa, naturaleza jurídica, recursos humanos y técnicos y otros que se estimen convenientes;
- b) Información relativa al laboratorio solicitante, tal como función principal, relación dentro de una empresa mayor, y ubicación física del laboratorio involucrado;

- c) Para cada laboratorio involucrado, si fuera mas de uno, el listado de los ensayos para los que se solicita la acreditación.
- d) Nombres de las personas designadas como responsables de la validez técnica de los informes de ensayos;
- e) Descripción de la organización interna y del sistema de calidad utilizado por el laboratorio solicitante que garantiza la calidad de los servicios de ensayo. Se incluye en esa descripción: la política de calidad, tabla del contenido del Manual de Calidad, reproducibilidad y exactitud de los resultados de los ensayos, programa de calibración de los equipos, rastreabilidad de las mediciones, listado del equipo utilizado, y otros similares.
- f) Modelo de los formatos de los informes de ensayos utilizados por el laboratorio solicitante.

EVALUADORES

Art. 8. a) Requisitos de los evaluadores.

Los evaluadores de los laboratorios deberán llenar los requisitos siguientes:

1. Ser conocedores de las disposiciones legales, los procedimientos y los requisitos de la acreditación, debiendo además ser ética y moralmente reconocidos en sus actuaciones.
2. Tener conocimiento del método de evaluación y de la documentación relacionada con este.

3. Ser técnicamente competentes en los ensayos o tipos de ensayos específicos para los que se solicita la acreditación y, cuando corresponda, en los procedimientos de muestreo asociados.
4. Estar libre de cualquier interés comercial que pueda inducirlos a actuar en forma parcial o discriminatoria.

b) Calificación de los evaluadores.

El sistema de acreditación tendrá un procedimiento adecuado para seleccionar y designar a los evaluadores, lo cual incluye la evaluación de su competencia técnica, entrenamiento y su participación en una o más evaluaciones con un evaluador calificado, según lo especificado en el Manual de Procedimientos.

c) Archivo de evaluadores

CONACYT elaborará y mantendrá actualizado un archivo sobre los evaluadores, en el que se condensarán los datos siguientes:

1. Nombre y dirección.
2. Cargo en la organización del empleador.
3. Formación y nivel profesional.
4. Experiencia de trabajo.
5. Capacitación en aseguramiento de la calidad; y,
6. Experiencia en la evaluación de laboratorios

d) Procedimientos para los evaluadores.

El CONACYT proporcionará a los evaluadores copia de los procedimientos actualizados para la evaluación y cualquier otra información relevante sobre disposiciones de acreditación.

- e) Procedimientos para la designación de evaluadores.
- f) El CONACYT dispondrá de procedimientos para:
 1. Asegurar que un evaluador calificado, con el acuerdo de su empleador, acepte ser designado para evaluar, en el plazo establecido, a un determinado laboratorio;
 2. Designar a un evaluador jefe;
 3. Proveer a los evaluadores con toda la información necesaria; para el caso, las principales normas que describen los ensayos para los que se solicita la acreditación, informes de evaluaciones previas, y otros similares.

DESIGNACIÓN DE EVALUADORES.

Art. 9. El laboratorio solicitante será informado de la fecha de la evaluación y de los nombres de evaluadores designados para realizarla. El laboratorio se reserva el derecho aceptar o rechazar cualquier evaluador. Los evaluadores serán designados formalmente, y su encargo estará claramente definido y será dado a conocer oportunamente al laboratorio solicitante.

EVALUACIÓN DEL LABORATORIO SOLICITANTE.

Art. 10. El laboratorio solicitante será sometido a una evaluación en el lugar de sus instalaciones por el grupo de evaluadores, quienes podrán ser acompañados por representantes de CONACYT.

DOCUMENTACIÓN CORRESPONDIENTE A LA EVALUACIÓN.

Art. 11. El equipo evaluador suministrará al CONACYT, un informe completo, con toda la información relevante referida a la capacidad del laboratorio solicitante para con los requisitos de la acreditación, incluyendo aquellos que puedan resultar de los ensayos de aptitud.

CONACYT hará del conocimiento del laboratorio solicitante, un informe completo sobre el resultado de la evaluación. El laboratorio será invitado a presentar sus comentarios sobre este informe en un plazo no mayor de quince días, y sobre las acciones correctivas a tomar, un plazo designado por el mismo, para subsanar aquellos requisitos de acreditación no cumplidos durante la evaluación.

El formulario de evaluación completado por el laboratorio, el informe pormenorizado sobre, el resultado de la evaluación, los comentarios recibidos del laboratorio solicitante luego de la evaluación y cualquier otra información relacionada, serán revisados por el CONACYT y manejados confidencialmente. El objeto de esta revisión consiste en determinar si la información recopilada demuestra que el laboratorio cumple o no con los requisitos de la acreditación.

MÉTODO DE EVALUACIÓN.

Art.12. CONACYT publicará, actualizará y pondrá a disposición del laboratorio solicitante y de los evaluadores, la descripción completa del método de evaluación utilizado para asegurar el cumplimiento de los requisitos de acreditación por parte de dicho laboratorio.

INFORME DE EVALUACIÓN.

Art. 13. El informe de evaluación se presentará en el modelo que para tal efecto CONACYT proporcionará a los evaluadores, e incluirá:

- a) Los nombres de los evaluadores;
- b) El nombre y dirección del laboratorio evaluado;
- c) El alcance de la acreditación solicitada y la concedida;
- d) Información sobre la calificación técnica, experiencia y autoridad del personal entrevistado especialmente de las personas responsables de la validez técnica de los informes de ensayo;
- e) Observaciones sobre si la organización interna y los procedimientos utilizados por el laboratorio solicitante son los adecuados para dar confianza en la calidad de sus servicios de ensayos;
- f) Información sobre cualquier ensayo de aptitud que el laboratorio haya realizado, los resultados de este, y el uso de los resultados obtenidos;
- g) Observaciones del grupo evaluador sobre el cumplimiento de los requisitos de acreditación;

- h) Observaciones sobre la presentación de los informes de ensayos; y,
- i) Observaciones sobre las acciones tomadas para corregir cualquier incumplimiento identificado en evaluaciones previas.

DECISIÓN SOBRE LA ACREDITACIÓN.

Art. 14. El dictamen técnico de los evaluadores será enviado a la Junta Directiva de CONACYT, a través del jefe del Departamento quien en base al dictamen técnico emitirá una resolución aprobando o denegando la acreditación del laboratorio.

La resolución favorable a la acreditación se constituye en la autorización que dispondrá el laboratorio para la realización de ensayos y demás actividades de forma oficial. Esta autorización se renovará cada año, siempre y cuando no haya incumplimiento a las disposiciones de este Reglamento.

Si la resolución deniega la acreditación a un laboratorio por no reunir estas condiciones necesarias, se informará por escrito al interesado cuales son sus deficiencias, quien al no estar de acuerdo presentará una nueva solicitud de acreditación cuando haya superado las deficiencias encontradas en la evaluación.

AMPLIACIÓN DEL ALCANCE DE LA ACREDITACIÓN.

Art. 15. CONACYT debe disponer de procedimientos escritos para la evaluación de los laboratorios que soliciten la ampliación de la acreditación para ensayos

adicionales. En estos casos se procederá a evaluar la competencia técnica del laboratorio para realizar tales ensayos, tal como se describe en el proceso de acreditación comprendido en el Art. 6.

ENSAYOS DE APTITUD.

Art. 16. Los laboratorios acreditados y los solicitantes, participarán en ensayos de aptitud, organizados por el CONACYT, cuando este así lo estime conveniente.

No se otorgará ni mantendrá una acreditación únicamente en base a los resultados de los ensayos de aptitud. CONACYT deberá asegurar que se ha establecido la precisión de los métodos utilizados en los ensayos de aptitud.

VIGILANCIA DE LOS LABORATORIOS ACREDITADOS

Art. 17. Una vez que un laboratorio ha sido acreditado, se realizará evaluaciones periódicas, para asegurar que el laboratorio continúa cumpliendo con los requisitos de acreditación.

INFORME DE ENSAYO DEL LABORATORIO ACREDITADO.

Art. 18. En general el laboratorio acreditado estará autorizado a hacer referencia a su acreditación solamente en los informes relacionados con los ensayos o tipos de ensayo para los que se otorgó la acreditación. Sin embargo, CONACYT podrá autorizar al laboratorio a incluir en dichos informes, los

resultados de ensayo a los que no se aplica al acreditación, siempre que dichos resultados sean identificados en forma clara y sin ambigüedades, sobre tal condición.

SUBCONTRATACIÓN POR LABORATORIOS ACREDITADOS.

Art. 19. CONACYT solamente permitirá a los laboratorios acreditados subcontratar los ensayos para los que se concedió la acreditación, siempre y cuando el laboratorio subcontratante este acreditado para los ensayos considerados.

SANCIONES POR INFRACCIONES.

Art. 20. Por denuncia escrita de la Dirección general de Protección al Consumidor del Ministerio de Economía o de cualquier interesado, CONACYT podrá suspender o cancelar la acreditación de un laboratorio, previa audiencia de los afectados, en los siguientes casos:

- a) Cuando el laboratorio al ser requerido, no proporcione en forma oportuna y completa los informes respecto a su funcionamiento y operación;
- b) Por suspender sin causa justificada sus actividades, por un periodo que exceda los treinta días;
- c) Por impedir u obstaculizar las funciones de vigilancia o auditoria que CONACYT autorice realizar en base a este reglamento;
- d) Por errores comprobados en los resultados de los análisis;

- e) Por modificar las instalaciones o personal técnico del laboratorio, de manera tal que no pueda cumplir satisfactoriamente con sus funciones;
 - f) Por negarse injustificadamente a prestar un servicio que le haya sido solicitado; y,
 - g) Por discriminación, a través del cobro, en la presentación de un servicio
- h) APLICACIÓN DE LAS SANCIONES.

Art. 21.-Las infracciones a que se refiere el Artículo anterior se sancionarán así:

- a) Por comisión de cualquiera de ellas, se suspenderá la acreditación del laboratorio por un periodo de tres meses, lo cual debe hacerse del conocimiento del laboratorio sancionado, indicando las causas de la suspensión;
- b) Se cancelará definitivamente la acreditación del laboratorio, por reincidencia en la infracción, o por que de ella resulte afectada la economía, la vida humana, animal, vegetal o el medio ambiente.

La imposición de cualquiera de las sanciones anteriores no afecta el ejercicio de la acción judicial correspondiente.

PUBLICIDAD DE LAS RESOLUCIONES.

Art. 22. CONACYT publicará trimestralmente en los medios que juzgue convenientes, la lista de laboratorios acreditados, la de los suspendidos y los cancelados, si los hubiere.

REGISTRO DE LABORATORIOS ACREDITADOS.

Art. 23. CONACYT mantendrá y actualizará periódicamente un registro de los laboratorios acreditados, describiendo para cada caso el alcance de la acreditación concedida así como las modificaciones u otras acciones relacionadas con la acreditación ⁽⁵⁾.

6.4 LINEAMIENTOS PARA LA ACREDITACION

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT establece las actividades que deben seguirse para la prestación del servicio de Acreditación a cualquier Laboratorio oficial o privado, que se dedique a la realización de pruebas, análisis y mediciones científicas, médicas, investigativas, industriales e ingenieriles o de cualquier otra índole que lo solicite.

Los lineamientos establecidos son los siguientes:

1. Presentar la solicitud de Acreditación al Director ejecutivo de CONACYT.
2. El Director ejecutivo refiere la solicitud al jefe del departamento de Normalización, Metrología y Certificación de la Calidad (NMCC) a mas tardar dos días hábiles después de recibida, este a su vez al Coordinador de Acreditación tres días después de haberla recibido.
3. Elaboración de cotización por parte de Coordinador de Acreditación y entrega de esta al jefe del Departamento de Normalización, Metrología y Certificación de la Calidad para su firma, así como una copia al jefe

Financiero y al Director ejecutivo; así mismo el Coordinador de Acreditación entrega formatos de solicitud y cuestionario de información.

4. El solicitante llena el formato de la solicitud de Acreditación y el cuestionario de información, y los entrega junto con los Manuales de Calidad, los Métodos a Acreditar y al mismo tiempo paga la tarifa del servicio.
5. Contratación de auditores por parte del Coordinador de Acreditación.
6. Presentación de nombres de auditores al Laboratorio solicitante y fecha propuesta para la realización de la auditoría.
7. Aceptación de los auditores y de la fecha propuesta, en forma escrita por parte del solicitante.
8. El Coordinador de Acreditación le informa a los auditores seleccionados que han sido contratados para efectuar la auditoría y confirmar al Laboratorio la fecha de la misma.
9. Reunión de los auditores para firmar el contrato y conocer la información proporcionada por el Laboratorio solicitante.
10. Realización de la auditoría en el Laboratorio solicitante haciendo uso de la lista de verificación y el formato para no conformidades; al mismo tiempo CONACYT evalúa el desempeño de los auditores.
11. Presentación del informe de la auditoría junto a la lista de verificación y formato para no conformidades a la jefatura del Departamento.

12. Posteriormente el jefe del Departamento de Normalización Metrología y Certificación de la Calidad y el Coordinador de la unidad de Acreditación revisan el informe proporcionado por los auditores y envían una copia al Laboratorio solicitante.
13. Si al revisar el informe, se demuestra que el Sistema de Calidad del Laboratorio no tiene NO CONFORMIDADES con relación a la norma con la que se esta acreditando, entonces el jefe del Departamento de Normalización Metrología y Certificación de la Calidad solicita por escrito a la Dirección ejecutiva la Acreditación del Laboratorio.
14. Si por el contrario, el informe indica la presencia de NO CONFORMIDADES, se informa al Laboratorio solicitante que dispone de tres meses para corregir las no conformidades, para si obtener la acreditación.
15. Una vez corregidas las NO CONFORMIDADES, el solicitante informa por escrito a la jefatura del Departamento de Acreditación, para programar una nueva visita y verificar la corrección de las no conformidades, luego de verificadas los auditores presentan el informe respectivo a la jefatura del Departamento.
16. El jefe del Departamento de Normalización Metrología y Certificación de la Calidad solicita por escrito a la Dirección ejecutiva la Acreditación del Laboratorio.
17. La solicitud de Acreditación se discute en la reunión más próxima de la Junta Directiva.

Finalmente la Dirección Ejecutiva del CONACYT informa por escrito al Laboratorio solicitante el acuerdo tomado por Junta Directiva sobre la aprobación o no de la Acreditación

CAPITULO VII

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN SALUD (CENSALUD)

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS
PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTO

ELABORADO POR

REVISADO POR

AUTORIZADO POR

INDICE

Introducción	106
Objetivo	106
Alcance	106
Responsabilidad	106
Procedimientos Normalizados de Análisis	
1 Aislamiento e identificación de <i>Yersinia enterocolítica</i>	107
2 Aislamiento e identificación de <i>shigella sp</i>	118
3 Aislamiento e identificación de <i>Listeria monocytógenes</i>	129
4 Aislamiento e identificación de <i>Campylobacter jejuni</i>	146
5 Aislamiento e identificación de <i>Vibrio vulnificus</i>	176
6 Recuentos de Mohos y levaduras	191
7 Aislamiento e identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	201
8 Aislamiento e identificación de <i>Clostridium botulinum</i>	218
9 Aislamiento e identificación de <i>E. coli</i> , bacterias coliformes	230
10 Aislamiento e identificación de <i>Salmonella sp</i>	247
11 Recuento e identificación de bacterias heterótrofas	279

INTRODUCCIÓN

En el presente manual se ha recopilado información bibliográfica de procedimiento de análisis microbiológico en alimentos en base a métodos oficiales sobre aquellos microorganismos que frecuentemente contaminan los alimentos, detallándose su aislamiento e identificación; cada procedimiento se ha elaborado basándose en la norma ISO/IEC 17025 contemplando partes importantes como el porque del procedimiento, su alcance, registros, aseguramiento de la calidad y otros, con el fin de orientar el trabajo realizado para obtener resultados confiables.

OBJETIVO

Describir los procedimientos normalizados de análisis microbiológicos de alimentos elaborados en base a la norma ISO / IEC 17025 para ser validados posteriormente

ALCANCE

Este manual es aplicable al Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) y a todo laboratorio que se dedica al análisis microbiológico de alimentos y pretenden acreditarse.

RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad de todo el personal de laboratorio realizar los análisis y manipular los equipos bajo los procedimientos descritos en este manual

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P.01
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Yersinia enterocolítica</i>	Página 1 de 11 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento de aislamiento e identificación de ***Yersinia enterocolítica*** que el laboratorio microbiológico de alimentos utiliza.

B. ALCANCES

Este procedimiento es aplicable a toda muestra de alimentos y para toda persona y empresa que lo solicite

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Yersinia enterocolítica: Es un bastoncillo gramnegativo que no fermenta la lactosa y es positiva a la ureasa y negativo a la oxidasa ⁽¹⁶⁾

D. POLÍTICAS

1. Los resultados de los análisis son confidenciales y específicos para el cliente que lo solicita.
2. Los Procedimientos de análisis deberán encontrarse al alcance de todo profesional encargado involucrado en el desarrollo del análisis.
3. Los materiales y reactivos utilizados son de la mejor calidad y los apropiados para los análisis.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P.01
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Yersinia enterocolítica</i>	Página 2 de 11 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista aplicar el procedimiento establecido; según la naturaleza de la muestra.

F. REGISTROS DE CALIDAD

Para llevar a cabo el procedimiento de análisis se proponen los siguientes documentos:

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de la muestra	Secretaria y Profesional encargado
Protocolo del analista	Profesional encargado
Limpieza y sanitización del área de trabajo	Auxiliar de laboratorio
Monitoreo ambiental	Profesional encargado
Fichas técnicas (preparación de reactivos y medios de cultivos.)	Auxiliar de laboratorio
Resultados de análisis	Profesional encargado

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

Yersinia enterocolítica es un bacilo gramnegativo no fermentador de lactosa, se le encuentra en el intestino de varios animales. Este puede producir una enterotoxina termoestable, así como yersiniosis, que es una enfermedad caracterizada por diarrea y vómitos.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P.01
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Yersinia enterocolítica</i>	Página 3 de 11 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Origen: Cerdo productos lácteos y agrícolas.

II. EQUIPO, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Equipo y Materiales

- a) Asas estériles
- b) Balanza
- c) Cajas de petri estériles de vidrio o plásticas
- d) Erlenmeyer estériles
- e) Gradilla
- f) Incubador
- g) Microscopio luz 900x
- h) Microscopio
- i) Pipetas graduadas estériles
- j) Pipeteadores
- k) Stomacher
- l) Tubos desechables de borocilicato

Medios de cultivo y Reactivos

- a) Agar Bilis Esculina
- b) Agar Christensen's Urea
- c) Agar hierro Lisina Arginina (LAIA)

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P.01
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Yersinia enterocolítica</i>	Página 4 de 11 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

- a) Agar MacConkey
- b) Agar novobiocin –Irgasan –Celfsulodin (CIN)
- c) Agar Yema de huevo (AEY), anaerobio
- d) Caldo bilis sorbitol peptonado
- e) Caldo MR-VP (Rojo de metilo –Voges Proskauer)
- f) Citrato de Simmons
- g) Cloruro férrico al 10% en agua destilada
- h) Hidróxido de potasio 0.5% en cloruro de sodio 0.5%, preparación reciente
- i) Medio de Movilidad
- j) Reactivo de Kovacs
- k) Reactivo de Prueba de Oxidasa
- l) Reactivo de prueba ureasa
- m) Reactivo de Voges –Proskauer
- n) Reactivo de prueba de indol
- o) Solución Salina al 0.5% estéril
- p) Tinción al Gram

III. PROCEDIMIENTO

A. Enriquecimiento

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P.01
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Yersinia enterocolítica</i>	Página 5 de 11 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

1. Analizar las muestras rápidamente después de recibidas o refrigerar a 4^oC (congelar las muestras antes del análisis no es recomendado, a menos que ***Yersinia*** haya sido recolectada de productos congelados.)
 2. Asépticamente pesar 25 g de muestra, adicionar 225 mL de Caldo Bilis Sorbitol Peptonado (PSBB).
 3. Homogenizar 30 seg. e incubar a 10^oC por 10 días.
 4. El décimo día, retirar el caldo de enriquecimiento del incubador y mezclar bien.
 5. Transferir 0.1 mL de caldo de enriquecimiento a 1 mL de KOH 0.5% en solución salina 0.5% y mezclar por 5 –10 seg.
 6. Sucesivamente estriar con asa complemente llena una placa de agar MacConkey y una placa de agar CIN.
 7. Transferir adicionalmente 0.1 mL de la muestra enriquecida (a 1 mL de solución salina al 0.5%) y mezclar 5-10 seg. Antes de estriar sobre agar MacConkey y agar CIN.
 8. Incubar las placas a 30^oC por 24 horas.
- B. Aislamiento de ***Yersinia***
1. Examinar la placa de agar MacConkey después de las 24 horas de incubación.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P.01
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Yersinia enterocolítica</i>	Página 6 de 11 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

2. Descartar las colonias rojas o mucoides. Seleccionar una colonia plana pequeña (1-2 mm de diámetro), incolora o rosa pálido.
3. Examinar las placas CIN después de 24 horas de incubación
4. Seleccionar las colonias pequeñas que tengan un centro rojo profundo con borde pronunciado rodeado de una zona clara incolora con borde entero
5. Inocular cada colonia seleccionada en agar Hierro Lisina Arginina (LAIA) inclinado, en agar urea Christesen's en placa o inclinado, y en agar Bilis esculina en placa o inclinado por picadura con asa de inoculación en punta
6. Incubar 48 horas a temperatura ambiente (22 -26⁰C).

C. Identificación

1. Usar el crecimiento de LAIA inclinado, estriar el cultivo en una placa de anaerobiosis Agar Yema de huevo (AEY)
2. Incubar a 22 -26⁰C por 48 horas.
3. Usar el crecimiento en AEY para comprobar la pureza del cultivo, en la reacción de lipasa (en 2 -5 días) prueba de oxidasa, tinción al Gram e inocular para pruebas bioquímicas.
4. Tomar colonias desde la superficie agar yema de huevo (AEY), e

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P.01
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Yersinia enterocolítica</i>	Página 7 de 11 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

inocular los siguientes medios para pruebas bioquímicas e incubar todas a temperatura ambiente (22 - 26⁰C), durante 3 días (excepto el medio de la prueba de movilidad y el caldo rojo de metilo –Voges proskauer (RM –VP), los cuales se incuban a 35 -37⁰C por 24 horas).

Prueba de Indol.

Añadir 0.2-0.3mL de reactivo de kovacs, el desarrollo de un color rojo profundo en la superficie del caldo indica prueba positiva.

Prueba de Voges Proskauer

Añadir 0.6 mL de alfa-naftol y agitar bien. Añadir 0.2 mL de solución de KOH 40% con creatina y agitar.

Leer los resultados después de 4 horas

IV. CALCULOS

No aplica

V. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Si el aislado inclinado da alcalino en la superficie y ácido en el fondo, no produce gas, no produce reacción de H₂S en LAIA. El cual es también ureasa positiva, presuntamente es ***Yersinia*** .Descartar los cultivos que producen H₂S y/o cualquier gas en LAIA o son ureasa negativa, lo dan

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P.01
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Yersinia enterocolítica</i>	Página 8 de 11
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

preferentemente los aislados típicos que fallan o hidroliza (ennegrece) la esculina.

Interpretación de resultados.

En la prueba de Indol el desarrollo de un color rojo profundo en la superficie del caldo indica prueba positiva, en la de Voges proskauer, el desarrollo de color rosa a rojo rubí en el medio indica prueba positiva.

También ***Yersinia*** es oxidasa negativa, Gramnegativas en la tinción al Gram.

Ver tabla de resultados en el literal de anexos

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

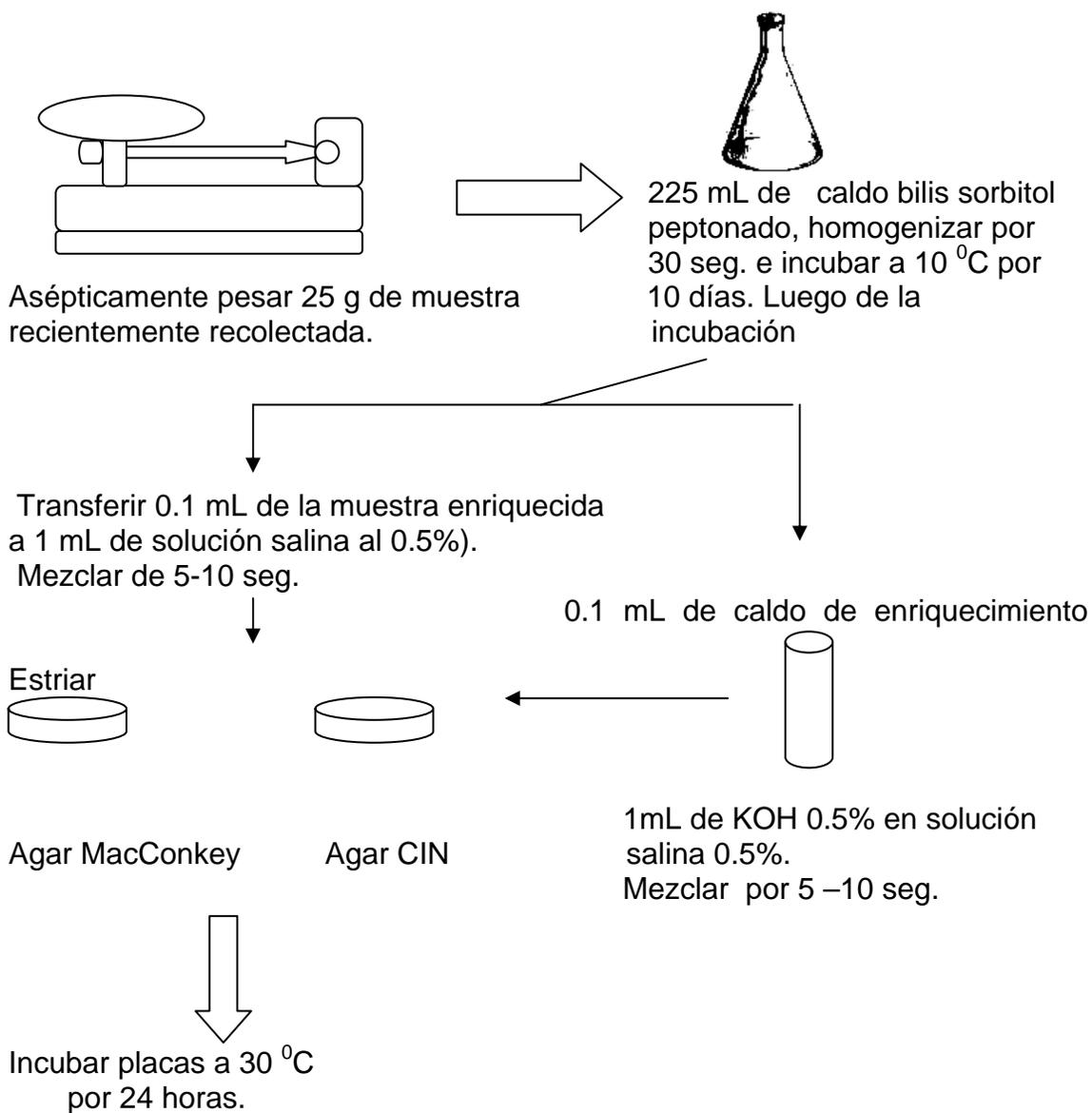
1. Se usa el crecimiento en AEY para comprobar la pureza del cultivo
2. Las muestras se analizan rápidamente después de recibidas o se refrigeran a 4⁰C antes del análisis.
3. En el desarrollo del procedimiento se siguen todas las medidas de higiene y de seguridad del laboratorio
4. Llevar controles positivos para asegurar confiabilidad en los resultados de análisis.

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

Aislamiento e identificación de ***yersinia enterolítica***

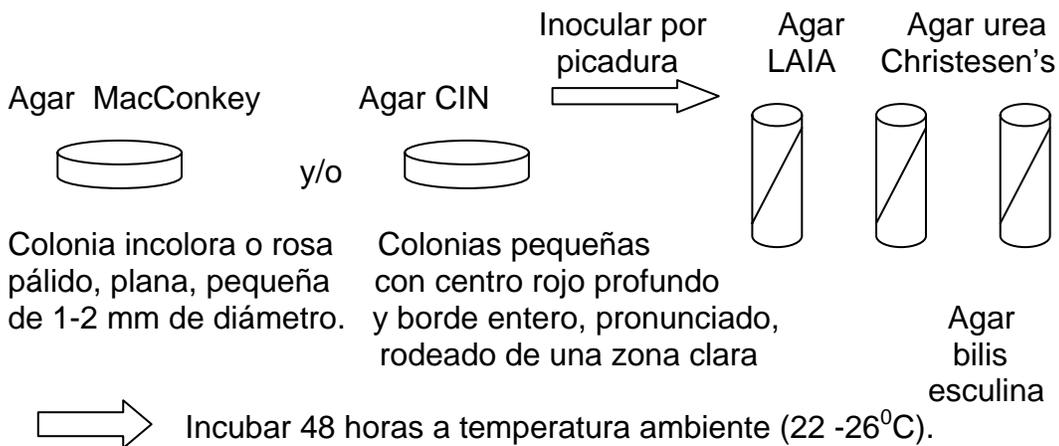
	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P.01
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Yersinia enterocolitica</i>	Página 9 de 11 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

A. Enriquecimiento

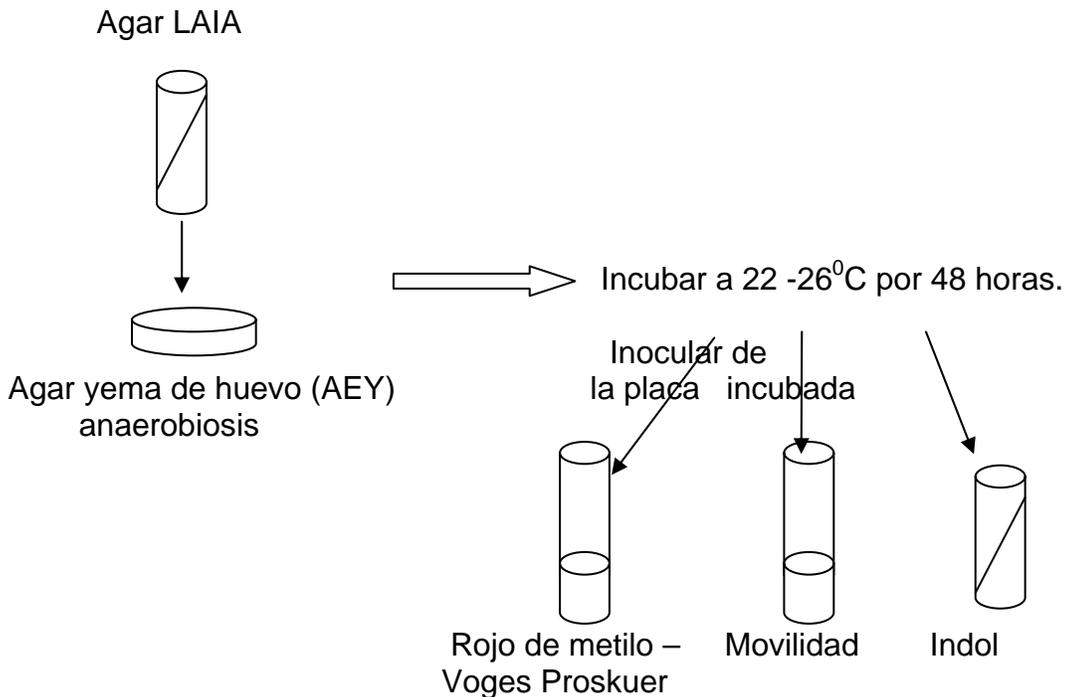


	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P.01
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Yersinia enterocolítica</i>	Página 10 de 11 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

B. Aislamiento



C. Identificación



	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 01
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Yersinia enterocolitica</i>	Página 11 de 11 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Prueba de oxidasa



Colocar crecimiento de la placa en papel humedecido con reactivo oxidasa. *Yersinia* es oxidasa (-)

0.6 mL de alfa-naftol
Y agitar bien
0.2 mL de solución
de KOH40%
con creatina, agitar

0.2-0.3mL de
reactivo
de kovacs

Tinción al Gram

Seguir técnica general ver anexo#1
Yersinia es gramnegativa.



Rojo de metilo –
Voges proskauer



Movilidad



Indol

H. BIBLIOGRAFÍA Y/O DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA

Bacteriological Analytical Manual FDA, 7ª edición 1992 Pág. 97 –104.

Bacteriological Analytical Manual FDA 8ª edición octubre 2001.

I. ANEXO

Tabla de Resultados de Pruebas Bioquímicas ⁽¹³⁾

Prueba o reacción	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Movilidad	+
Indol	+/-
Voges proskauer	+/- (+)
Ureasa	+
Tinción al Gram	Gram (-)
Oxidasa	-
Lipasa	+/-
Agar esculina	+/-

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 02
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Shigella sp</i>	Página 1 de 11
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento que el laboratorio microbiológico de alimentos utiliza para el aislamiento e identificación de *Shigella sp*.

B. ALCANCE

Este procedimiento se aplica a toda muestra de alimentos para la que se solicita el análisis.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Estéril: Libre de todo organismo vivo

Shigella sp: Bacilo gramnegativo delgado, anaerobio facultativo. Las colonias son de forma convexas, circulares y transparentes; fermentan la glucosa, forman ácidos a partir de los carbohidratos; pero rara vez producen gas ⁽¹⁹⁾

D. POLÍTICAS

Los resultados de los análisis son confidenciales y específicos para el cliente que lo solicita.

Procedimientos de análisis deberán encontrarse al alcance de todo profesional encargado involucrado en el desarrollo del análisis.

Los materiales y reactivos utilizados son de la mejor calidad y los apropiados para los análisis.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 02
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Shigella sp</i>	Página 2 de 11
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista aplicar el procedimiento según la naturaleza de la muestra.

F. REGISTROS DE CALIDAD

Para llevar a cabo el procedimiento de análisis se proponen los siguientes documentos:

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de la muestra	Secretaria y Profesional encargado
Protocolo del analista	Profesional encargado
Limpieza y sanitización del área de trabajo	Auxiliar de laboratorio
Monitoreo ambiental	Profesional encargado
Fichas técnicas (preparación de reactivos y medios de cultivos)	Auxiliar de laboratorio
Resultados de análisis	Profesional encargado

G. DESAROLLO

I. INTRODUCCION

El genero ***Shigella sp*** produce aproximadamente 300,000 casos de enfermedades diarreicas. La falta de higiene hace que ***Shigella sp*** sea fácilmente transmitida de persona a persona, siendo su origen de-

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 02
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Shigella sp</i>	Página 3 de 11
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

transmisión: ensaladas, leche, productos lácteos, agua sucia mariscos, verduras crudas, y patios mexicanos.

El género *Shigella sp* consiste en cuatro especies: *S. dysenteriae* (subgrupo un); *S. flexneri* (subgrupo B), *S. boydii* (subgrupo C), y *S. sonnei* (Subgrupo D). Las *Shigellas sp* pueden ser muy difícil de distinguirse bioquímicamente de *Escherichia coli*. *Shigella sp* son bacterias gramnegativas anaerobias facultativas, productoras de ácido pero no gas.

II. EQUIPO, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Equipo y Materiales

- a) Asa en punta y asa en anillo estéril
- b) Balanza semianalítica con sensibilidad de 0.1g
- c) Baño de agua, circulando, control de termostático, mantenido a 42 ± 0.2 °C
- d) Cajas de petri estériles
- e) Erlenmeyer 500mL
- f) Jarra de anaerobiosis con catalizador
- g) Microscopio
- h) Pipetas graduadas de 1mL

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 02
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Shigella sp</i>	Página 4 de 11
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Medios de Cultivo y Reactivos

- a) Agar citrato cistina
- b) Agar hierro triple azúcar(TSI)
- c) Agar inclinado carne de ternera
- d) Agar macConkey
- e) Caldo ***Shigella sp*** con novobiocin
- f) Caldo triptona 1%
- g) Caldo tripticasa soya- extracto de levadura (TSYE)
- h) Caldo urea
- i) Indicador rojo de metilo
- j) Medio MR- VP
- k) Medio para prueba de motilidad
- l) Reactivo de Kovacs
- m) Reactivo Voges- Proskauer
- n) Solución hidróxido de sodio 1N (NaOH)
- o) Solución de ácido clorhídrico 1N (HCL)
- p) Solución salina fisiológica 0.85%

III. PROCEDIMIENTO

Enriquecimiento

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 02
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Shigella sp</i>	Página 5 de 11
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

MÉTODO DEL CULTIVO CONVENCIONAL

- Enriquecimiento para ***Shigella sp sonnei***
 1. Pesar asépticamente 25 g de muestra en 225 mL de caldo ***Shigella sp*** al que se le ha agregado 0.5 µg/mL de novobiocin
 2. Mantenga la suspensión 10 min. a temperatura ambiente y agite periódicamente; vaciar el sobrenadante en erlenmeyer estéril de 500 mL
 3. Si es necesario ajuste pH a 7.0 ± 0.2 con NaOH 1N estéril o HCL 1N
 4. Colocar el frasco en la jarra de anaerobiosis, con un catalizador fresco; inserte Gas pack y active añadiendo agua, debido a la alta humedad dentro del frasco, se recomienda catalizador de calor después de cada uso.
 5. Incubar los frascos en baño de agua a 44°C por 20 horas
 6. Agitar la suspensión de cultivo enriquecido y estriar sobre agar MacConkey. Incubar 20 horas a 35°C
- Enriquecimiento para otras especies de ***Shigella sp***

Proceder como anteriormente, pero usar novobiocin 3µg/mL e incubar en anaerobiosis en baño de agua a 42 °C

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 02
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Shigella sp</i>	Página 6 de 11
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

B. Aislamiento

1. Examinar las placas de agar MacConkey. Las colonias de *Shigella sp* son ligeramente rosadas y traslucidas, con o sin bordes ásperos
2. Inocular las colonias sospechosas en los siguientes medios: Caldo glucosa, agar inclinado TSI, caldo descarboxilasa lisina, agar movilidad y triptona. Incubar a 35°C por 48 horas; pero examinar a las 20 horas.
3. Descartar todos los cultivos que muestren: movilidad, H₂S, formación de gas, descarboxilación lisina y fermentación de sucrosa o lactosa.
4. Con respecto a la formación de indol, descartar cultivos positivos del enriquecimiento a 44°C
5. Todos los aislamientos sospechosos del enriquecimiento a 42°C, pueden ser positivos o negativo y por consiguiente deben retenerse.

Caracterización fisiológica

1. Realizar la tinción al gram e inocular las colonias que de la investigación den reacciones satisfactorias a otras reacciones bioquímicas recomendadas.
2. Con las coloraciones que han dado reacciones positivas para *Shigella sp* realizar otras pruebas bioquímicas recomendadas como: sucrosa,.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 02
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Shigella sp</i>	Página 7 de 11
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

adonitol, inositol, lactosa (2 días), KCN, malonato, citrato, salicina y rojo de metilo

3. Seleccionar, colonias aisladas, positivos para ***Shigella sp***, y sembrar por picada en Agar Infusión carne de ternera inclinado

IV. CALCULOS

No aplica

V. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Shigella sp es un cocobacilo gramnegativo, negativo para H₂S, ureasa, glucosa (gas) movilidad, lisina descarboxilasa, sucrosa, adonitol, inositol, lactosa (2 días) KCN, malonato, citrato, y salicina, positivo para rojo de metilo.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

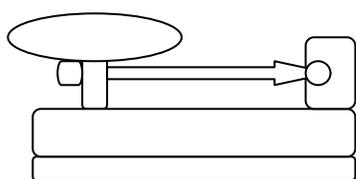
1. Todo el material utilizado para el análisis deberá ser lavado, empacado, y esterilizado mediante procedimientos adecuados.
2. Verificar la calidad de los medios de cultivo antes de ser utilizados

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 02
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Shigella sp</i>	Página 8 de 11 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

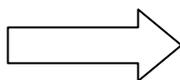
VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ***Shigella sp***

A. Enriquecimiento



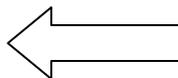
Pesar 25 g de muestra



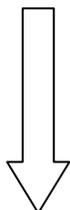
225 mL de caldo ***Shigella sp*** +
0.5 µg /mL novobiocin



Vaciar sobrenadante
PH 7 ± 0.2 con NaOH
o HCl 1 N.

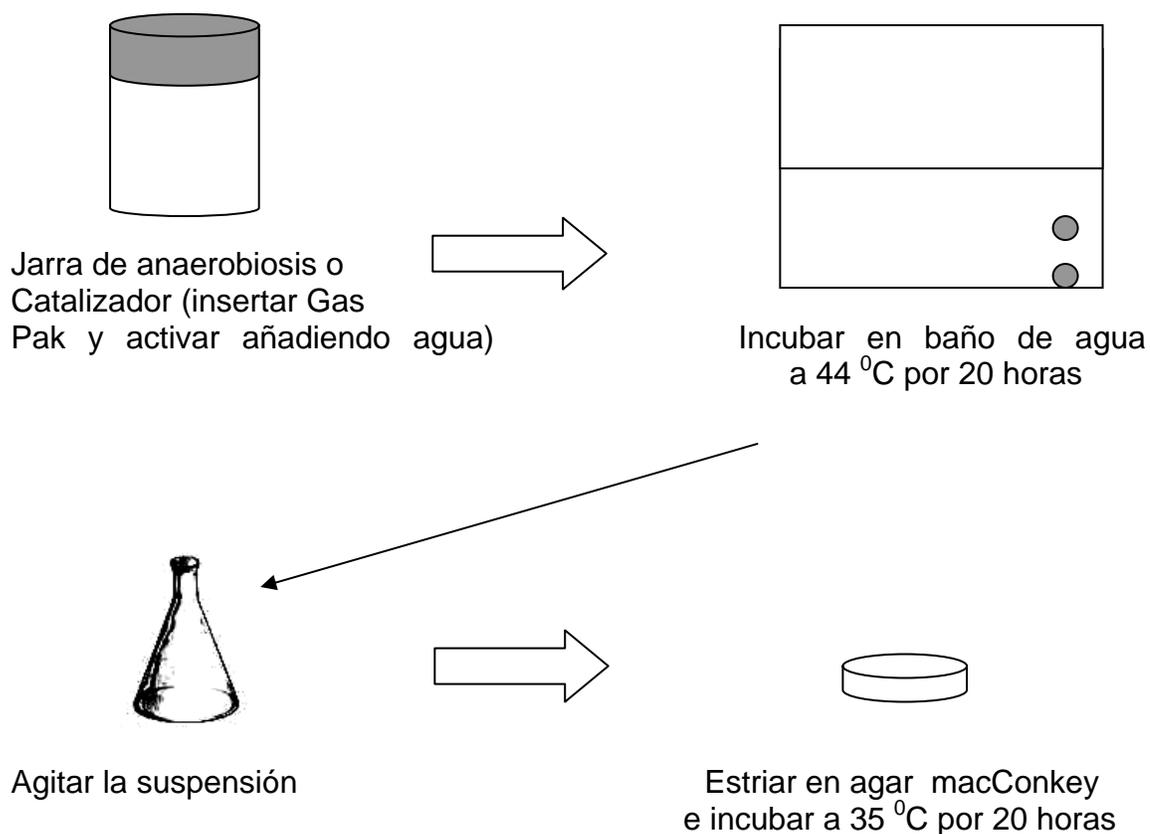


Mantener la suspensión
10 min. a temperatura
ambiente; agitar
Periódicamente.



Continúa en Pág. Siguiete

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 02
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Shigella sp</i>	Página 9 de 11 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

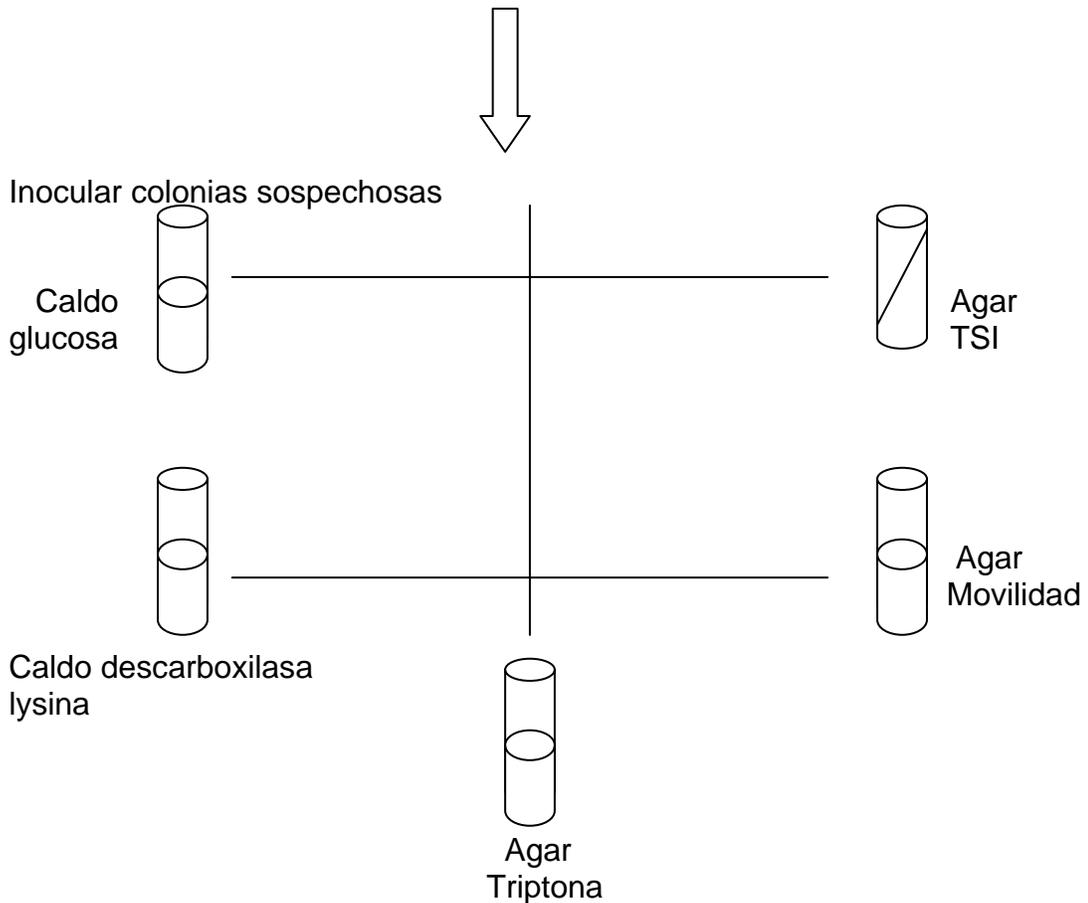


Nota: Para el enriquecimiento de otras especies de ***Shigella sp***, seguir procedimiento anterior usando novobiocin 3 µg /mL e incubar en anaerobiosis en baño de agua a 42 °C.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 02
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Shigella sp</i>	Página 10 de 11 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

B. Aislamiento

Examinar placas de agar macConkey
Shigella sp : Colonias ligeramente rosadas
 Y traslucidas; con o sin bordes ásperos.



Incubarlos todos a 35 °C por 48 horas; examinar a las 20 horas ⁽¹³⁾.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 02
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Shigella sp</i>	Página 11 de 11
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

H. BIBLIOGRAFIA Y/O DOCUMENTOS DE REFERENCIA

Bacteriological Analytical Manual on line FDA; noviembre 2001 Oficial

Methods of Análisis of the AOAC, cuarta edición, 1984, Pág. 963

I. ANEXO

No aplica

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 03
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i>	Página 1 de 17 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento que el laboratorio microbiológico de alimentos utiliza para el aislamiento e identificación de ***Listeria monocytogenes***.

B. ALCANCE

Este procedimiento se aplica a toda muestra de alimento para la que se solicita el aislamiento e identificación de ***Listeria monocytogenes***.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Estéril: Libre de todo organismo vivo

Listeria monocytogenes: Es un bacilo Grampositivo corto que no forma esporas y es anaerobio facultativo ⁽¹³⁾.

D. POLÍTICAS

1. Los resultados de los análisis son confidenciales y específicos para el cliente que lo solicita.
2. Procedimientos de análisis deberán encontrarse al alcance de todo profesional encargado involucrado en el desarrollo del análisis
3. Los materiales y reactivos utilizados son de la mejor calidad y los apropiados para los análisis.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 03
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i>	Página 2 de 17 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

4. Mantener el equipo en condiciones adecuadas para su óptimo funcionamiento en el desarrollo del análisis.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista cumplir con el procedimiento descrito según la naturaleza de la muestra.

F. REGISTROS DE CALIDAD.

Para llevar a cabo el procedimiento de análisis se proponen los siguientes documentos:

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de la muestra	Secretaria y Profesional encargado
Protocolo del analista	Profesional encargado
Limpieza y sanitización del área de trabajo	Auxiliar de laboratorio
Monitoreo ambiental	Profesional encargado
Fichas técnicas (preparación de reactivos y medios de cultivos)	Auxiliar de laboratorio
Resultados de análisis	Profesional encargado

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 03
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i>	Página 3 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCIÓN

Este es un bacilo gramnegativo que causa listeriosis, una enfermedad grave en mujeres embarazadas, recién nacidos y adultos con un sistema inmune débil. Origen: Suelo y agua. Se ha encontrado en productos lácteos incluyendo quesos blandos así como también en carne cruda y mal cocida, en pollos y productos del mar frescos o en conserva

II. EQUIPO, MEDIO DE CULTIVO Y REACTIVOS

Equipo y Materiales

- a) Asas circulares
- b) Asas en punta
- c) Balanza
- d) Bolsas estériles de stomacher
- e) Cajas de petri
- f) Frascos Erlenmeyer, 500 mL
- g) Incubadora
- h) Lámpara de luz blanca
- i) Pipetas 25, 10, 1 mL
- j) Refrigeradora

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 03
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i>	Página 4 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

k) Stomacher

l) Tubos 16 x 125 mm u otros tamaños apropiados con tapón de rosca

Medio de Cultivo y Reactivos

a) Agar Palcam y agar Oxford

b) Agar sangre de carnero al 5%

c) Agar TSA + EY

d) Agar TSI

e) Caldo de enriquecimiento de *Listeria* (EB)

f) Caldo rojo fenol base

g) Caldo tripticasa soya + EY (TSB+EY)

h) Carbohidratos al 0.5%(dextrosa, maltosa, manitol, ramnosa).

i) Medio de prueba de motilidad

j) Medio Voges proskaver

k) Peroxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3 %

l) Reactivo de Erlich

m) Rojo de metilo

n) Solución de alfa naftol

o) Solución de Hidróxido de Potasio (KOH)

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 03
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i>	Página 5 de 17 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

III. PROCEDIMIENTO

PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA

A. Enriquecimiento:

1. En forma aséptica se toma una muestra de 25 gramos asegurando que represente la superficie exterior e interior del alimento
2. Agregar 225 mL de caldo de enriquecimiento de *Listeria* (EB) en bolsas estériles y se coloca en el stomacher por 30 segundos
3. Incubar por 24 - 48 horas a 35 °C.

B. Aislamiento:

1. Después de 24 ó 48 horas de incubación, estriar el cultivo (EB) en forma duplicada en placas de agar Oxford (OXA) y en agar Palcam
2. Incubar las placas Oxford y Palcam a más o menos 35°C por 24 -48 horas
3. Después de incubadas las placas de Oxford y Palcam por 24 horas, se refrigeran las placas a 4°C por 24-48 horas para su óptimo crecimiento.
4. En agar Palcam y agar Oxford las colonias son negras grisáceas umblicadas.
5. Transferir 5 o más colonias típicas del agar Palcam en forma duplicada en placas de TSA + EY

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 03
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i>	Página 6 de 17 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

6. Incubar las placas de TSA + EY a 35⁰C por 24-48 horas

C. Identificación:

Esta se realiza por medio de las siguientes pruebas

1. Revisar las placas TSA + EY para la identificación de colonias típicas con el sistema de iluminación de Henry las colonias aparecen de color azul-gris.
2. Elegir una colonia típica de la placa incubada a 35⁰C en agar Oxford para incubarla en forma duplicada en caldo tripticasa soya + EY (TSB+EY), incubar a 35⁰C por 24 horas.

PRUEBAS PRESUNTIVAS

Catalasa

Se escoge una colonia típica de una placa de TSA + EY con asa en puntas y se coloca sobre un porta objetos conteniendo una gota de Peroxido de hidrógeno al 3% (H₂O₂), un burbujeo en los primeros segundos indica reacción positiva.

Hemólisis

Inocular con asa en punta, colonias típicas de placas de TSA + EY a placas de agar sangre de carnero al 5%.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 03
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i>	Página 7 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Dibujar 20-25 cuadros en la base de la placa y punzar una colonia por espacio cuadrulado de la placa, incubar por 48 horas a 35 °C, en las placas se observa una ligera zona clara alrededor de la punzada.

Prueba de Camp

En placas de agar sangre de carnero estriar en forma paralela *Staphylococcus aureus*, luego en forma vertical al estriado de *Staphylococcus aureus* estriar el microorganismo en prueba, incubar las placas a 35 °C, por 24-48 horas.

Después de incubadas las placas por 24 horas se determina la hemólisis en la convergencia con la estría vertical formando una punta de flecha.

Motilidad

De las placas de TSA +EY con una asa en punta elegir una colonia típica e inocular un tubo que contenga medio motilidad, incubar por 7 días a temperatura ambiente y se confirma por la formación de un crecimiento en forma de sombrilla en el medio.

CONFIRMACIÓN BIOQUÍMICA

Agar TSI

Se siembra utilizando una asa en punta, colonias en estrías sobre la superficie del agar y por picadura en el fondo, se incuban los tubos

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 03
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i>	Página 8 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

inoculados durante 1 ó 2 días a 37 ± 1 °C, y se interpretan los cambios en el cuadro de resultados.

Reacción de Voges Proskauer

1. Se inocula utilizando una asa circular, un tubo que contenga 0.5mL de medio Voges Proskauer, suspendiendo una porción de la colonia en exámen y se incuba durante 24 a 37 ± 1 °C.
2. Después de la incubación, se agrega al tubo 3 gotas de solución alcohólica de alfa naftol y luego 2 gotas de la solución de hidróxido de potasio; se agita luego de la adición de cada reactivo.
3. Un color rosado o rojo brillante desarrollado dentro de los 15 min. siguientes indican reacción positiva.

Reacción de Indol

1. Se inocula un tubo que contenga 1 mL del medio con la colonia en exámen y se incuba durante 24 horas a 37 ± 1 °C.
2. Después de la incubación se agrega 0.5 mL del reactivo de Erlich, la formación de un anillo rojo indica reacción positiva y la formación de un anillo amarillo marrón indica reacción negativa.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 03
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i>	Página 9 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Rojo de Metilo

Se inocula un tubo que contenga rojo de metilo con la colonia en examen y se incuba por 24 horas a 37 ± 1 °C. Después de incubar, se agrega 1-2 gotas de reactivo rojo de metilo, la aparición de color rojo indica una prueba positiva.

Prueba de Carbohidratos

A partir del cultivo de TSA + EY, inocular las siguientes soluciones de carbohidratos al 0.5% (P/V) en caldo rojo fenol base: dextrosa, maltosa, manitol, ramnosa.

Incubar por 24 horas a 35°C

IV. CALCULOS

No aplica

V. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Para la prueba en agar TSI después de 24 horas de incubación la aparición de un color amarillo en todo el medio se reporta como A/A, rojo en la superficie y amarillo en el fondo como K/A

En la prueba de Voges Proskauer el desarrollo de un color rosado o rojo brillante desarrollado dentro de los 15 min. siguientes indican reacción positiva para la reacción de Indol, la formación de un anillo rojo indica

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 03
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i>	Página 10 de 17 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

reacción positiva y la formación de un anillo amarillo marrón indica reacción negativa

La prueba Rojo de metilo el desarrollo de una coloración roja al adicionar el reactivo Rojo de metilo se considera prueba positiva, una coloración amarilla o anaranjada es prueba negativa

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

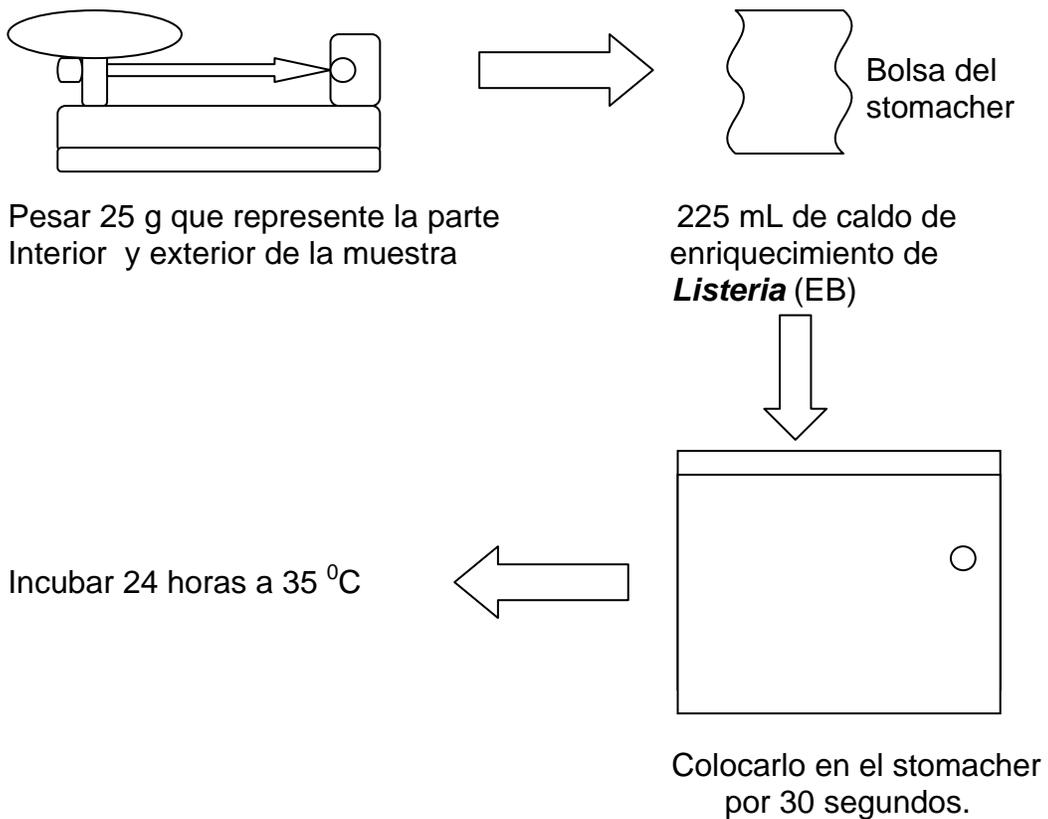
1. Las condiciones de higiene e instalaciones del laboratorio son las necesarias para realizar análisis microbiológico de alimentos.
2. Revisar el buen funcionamiento del equipo y materiales antes de empezar un análisis.
3. Para cada uno de los ensayos realizados se cuenta con el equipo y materiales adecuados.
4. El analista encargado de llevar a cabo el análisis es un profesional experimentado y con el más alto grado de responsabilidad en su trabajo.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 03
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i>	Página 11 de 17 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

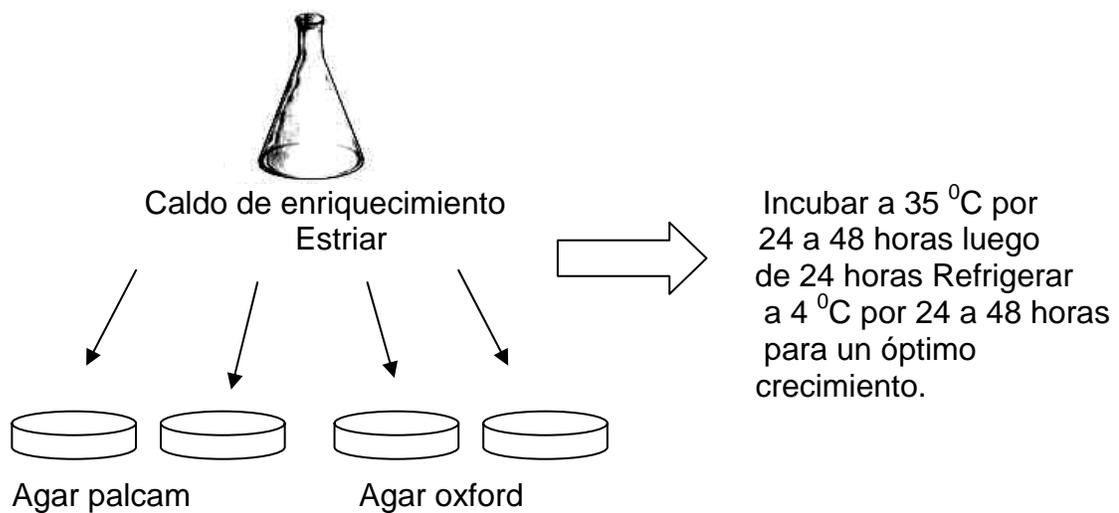
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Listeria monocytogenes*

A. Enriquecimiento

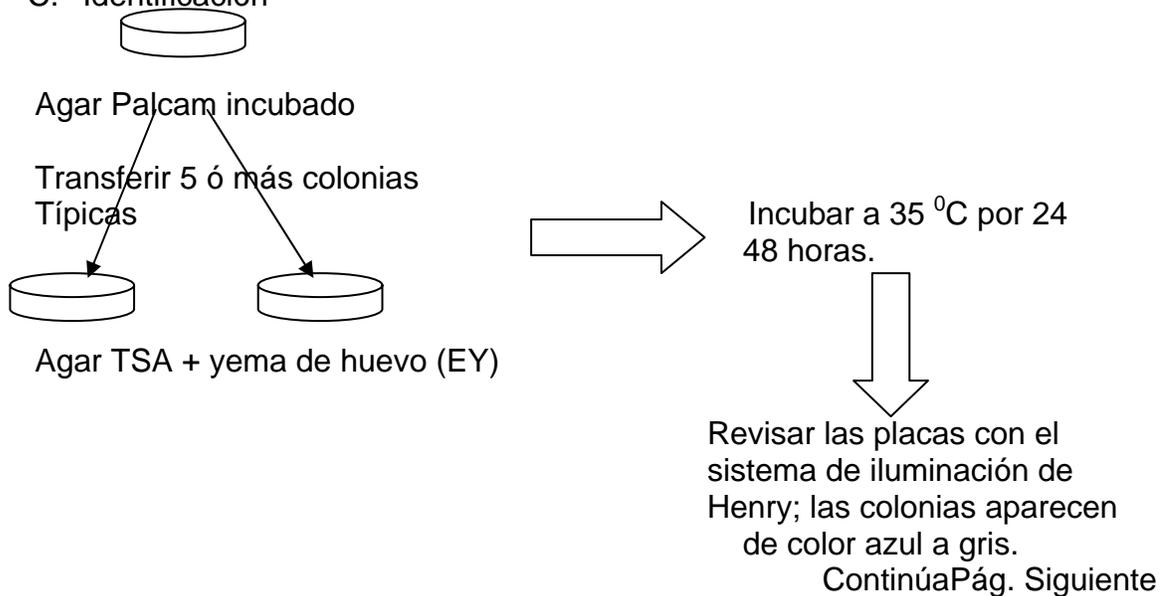


	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 03
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i>	Página 12 de 17 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

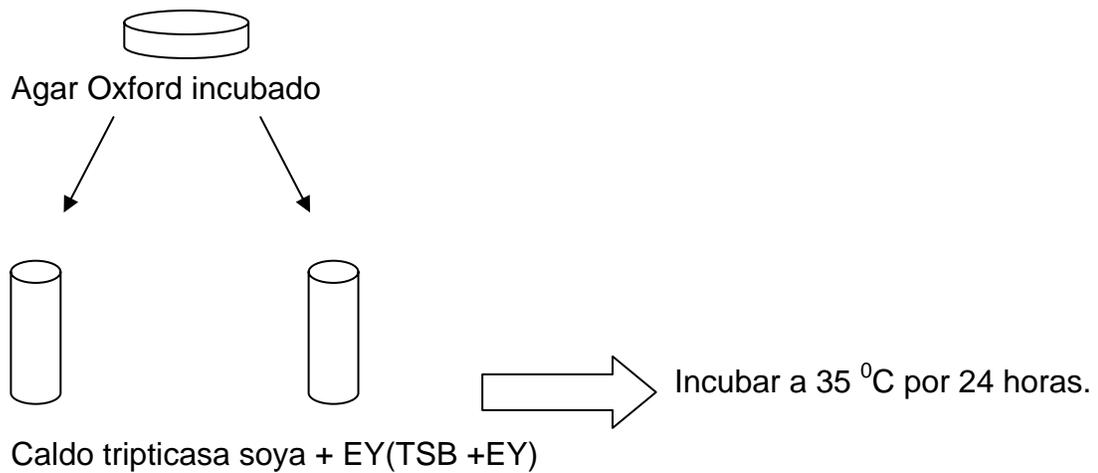
B. Aislamiento



C. Identificación

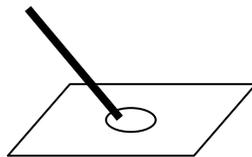


	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 03
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i>	Página 13 de 17 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

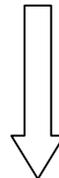


PRUEBAS PRESUNTIVAS

Catalasa



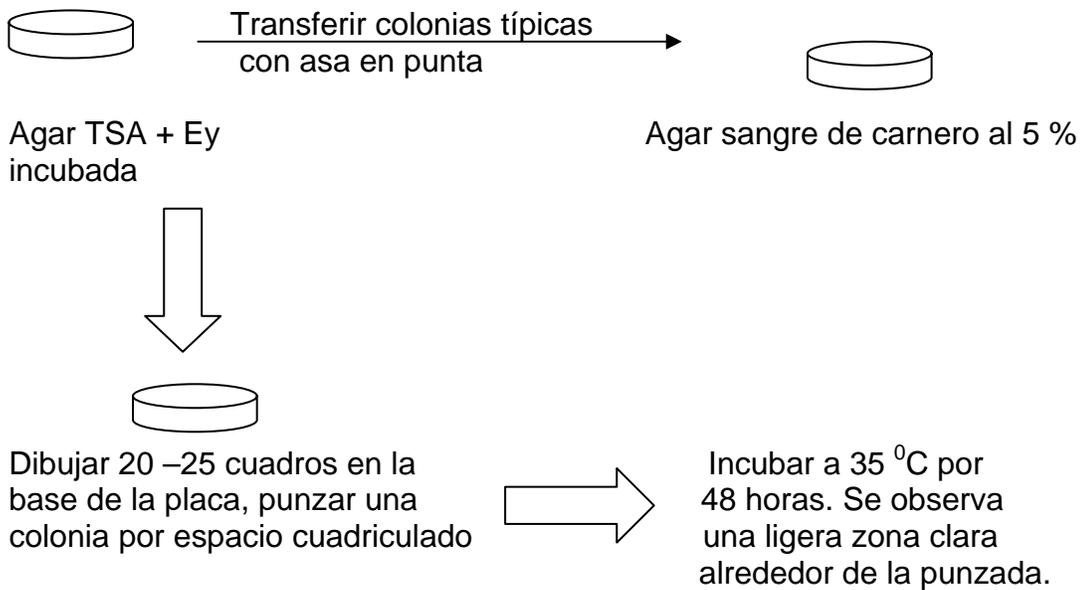
Extender la colonia típica en una gota de H₂O₂ 3%.



Burbujeo inmediato es reacción positiva.

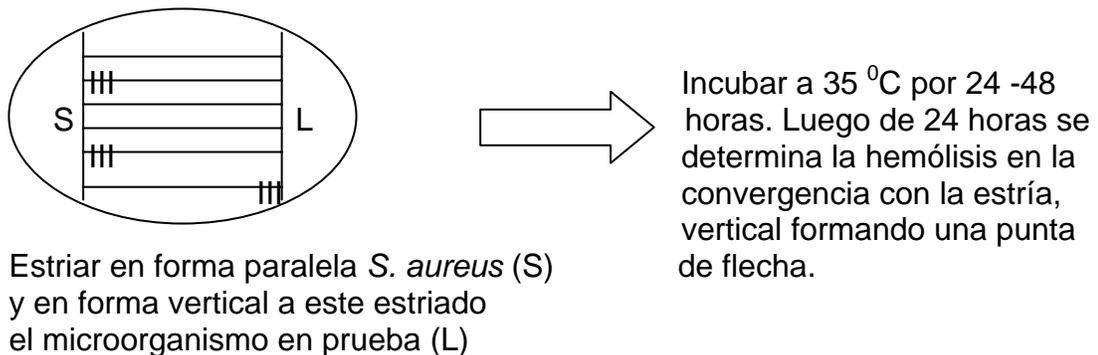
	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 03
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i>	Página 14 de 17 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Hemólisis



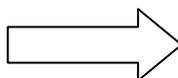
Prueba de Camp

Placa agar sangre de carnero



	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 03
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i>	Página 15 de 17 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Prueba de Motilidad

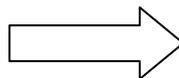
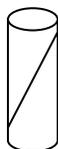


Se confirma por la formación de crecimiento en forma de sombrilla en el medio.

Inocular con colonia típica, incubar por 7 días a temperatura ambiente.

CONFIRMACIÓN BIOQUÍMICA

Agar TSI



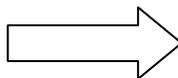
Incubar a 37 ± 1 °C por 1 a 2 días.

Inocular por punzada en el fondo y en estría en la superficie

Reacción de Indol



1 mL de medio



Incubar durante 24 horas a 37 ± 1 °C. Luego agregar 0.5 mL de reactivo de Erlich, la formación de anillo rojo es reacción positiva.

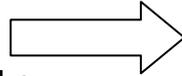
Inocular la colonia en prueba

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 03
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i>	Página 16 de 17 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Rojo de Metilo

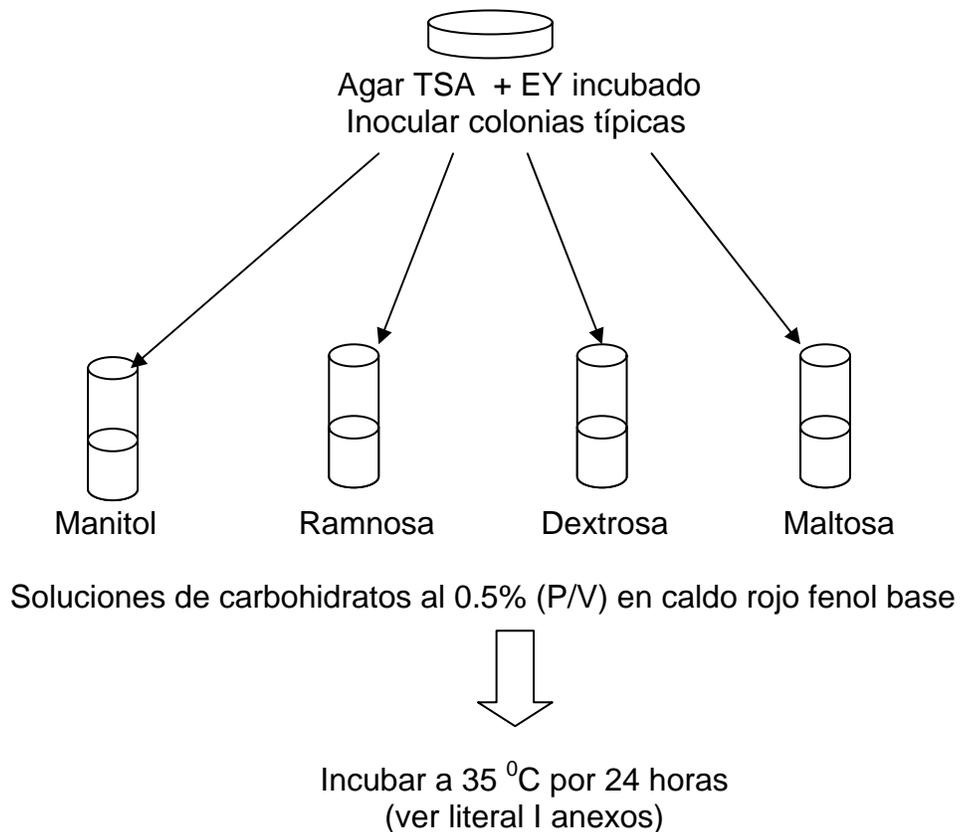


Se inocula la colonia en prueba y se incuba por 24 horas a 37 ± 1 °C.



Luego se agrega 1 –2 gotas de reactivo rojo de metilo, la aparición de color rojo indica reacción positiva.

Prueba de Carbohidratos



	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 03
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i>	Página 17 de 17 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

H. BIBLIOGRAFÍA Y/O DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA

Bacteriological Analytical Manual, 7th Edición, Revision A, 1998. Chapter 10,
Author: Anthony D. Hitchins, Draft Revision: 2002-September. Pág. 141 –
148.

I. ANEXOS

REACCIONES BIOQUÍMICAS DE *Listeria monocytogenes*

PRUEBA O SUSTRATO	RESULTADOS		REACCION DE <i>Listeria monocytogenes</i>
	POSITIVO	NEGATIVO	
Glucosa (TSI)	Fondo amarillo	Fondo rojo	+
Prueba del Indol	Violeta en superficie	Amarillo en superficie	-
Voges –Proskauer	Rosado –rojo	No cambia color	+
Rojo de metilo	Rojo difuso	Amarillo difuso	+
Motilidad	Formación de un crecimiento en forma de sombrilla	No formación de crecimiento	+
Catalasa	Produce burbujeo en los primeros segundos	No produce burbujeo	+
Ramnosa			+
Dextrosa			+
Maltosa			+
Manitol			-

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 1 de 30 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento utilizado para el Aislamiento e Identificación de ***Campylobacter jejuni*** en alimentos.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable a toda muestra de alimentos, para los que el cliente solicite el análisis.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Campylobacter jejuni: Son bacilos Gramnegativos, con forma de coma o ala de gaviota, dotados de movilidad ⁽¹³⁾.

D. POLÍTICAS

1. Los resultados de los análisis son confidenciales y específicos para el cliente que lo solicita.
2. Procedimientos de análisis deberán encontrarse al alcance de todo profesional encargado involucrado en el desarrollo del análisis.
3. Los materiales y reactivos utilizados son de la mejor calidad y los apropiados para los análisis.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista aplicar el procedimiento según la naturaleza de la muestra.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 2 de 30
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

F. REGISTROS DE CALIDAD

Para llevar a cabo el procedimiento de análisis se proponen los siguientes documentos:

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de la muestra	Secretaria y Profesional encargado
Protocolo del analista	Profesional encargado
Limpieza y sanitización del área de trabajo	Auxiliar de laboratorio
Monitoreo ambiental	Profesional encargado
Fichas técnicas (preparación de reactivos y medios de cultivos)	Auxiliar de laboratorio
Resultados de análisis	Profesional encargado

G. DESAROLLO

I. INTRODUCCION

Campylobacter jejuni es un tipo de bacteria que infecta el tracto gastrointestinal. Generalmente se transmite a través de los alimentos, siendo la causa más común de diarrea.

Origen: Carnes, y pollos crudos, o mal cocinados, leche cruda, y agua sin tratamiento.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 3 de 30 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

I. EQUIPO, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Equipo y Materiales

- a) Asas estériles
- b) Baño de agua
- c) Cajas de petri
- d) Centrífuga refrigerada
- e) Erlenmeyers
- f) Hisopos
- g) Incubador con agitador aerofilico
- h) Incubador
- i) Jarra de anaerobiosis
- j) Papel aluminio
- k) Sostenedor de hierro de cajas de petri
- l) Stomacher
- m) Sobres generadores de anaerobiosis
- n) Termo

Medios de cultivo y Reactivos

- a) Agar Abeyta –Hunt –Bark (AHB)
- b) Agar ***campylobacter*** modificado libre de sangre (CCDA)

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 4 de 30 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

- c) Agar inclinado de infusión de corazón (HIA)
- d) Agua peptonada 0.1%
- e) Caldo base Bolton *(Caldo Base de Enriquecimiento)
- f) Caldo de enriquecimiento para ***Campylobacter***
- g) Etanol al 70 %
- h) Medio semisólido modificado
- i) Solución de hipoclorito
- j) Sangre lisado de caballo
- k) Solución de NaOH 2N
- l) Solución de Peptona 0.1%
- m) Vial rehidratado de suplemento de antibiótico Bolton

* Añadir dos viales rehidratados de suplemento de antibiótico Bolton y 50 mL de sangre lisado de caballo a 1000 mL de caldo base Bolton

II. PROCEDIMIENTO

A. Preparación de la muestra

- a. Preparación para todos los alimentos excepto los mencionados más adelante

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 5 de 30 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

1. Colocar la bolsa de filtro de stomacher en el sostenedor de hierro de cajas de petri (parecido al usado en la jarra de anaerobiosis).
2. Colocar el broche a la boca de la bolsa y apretar para prevenir que el forro caiga dentro de la bolsa durante del llenado
3. Pesar 25g de muestra (50g si es fruta o vegetales) dentro de la bolsa y añadir 100mL de caldo de enriquecimiento
4. Retirar la bolsa del sostenedor, mantener el broche en su lugar y tapar cerrando la parte superior de la bolsa
5. Colocar la bolsa en una canasta o en un colgadero giratorio. Agitar suavemente por 5 min. o colocar sobre la superficie de la mesa un mezclador (Stomacher) a una velocidad de 25 rpm.
6. Luego dejar reposar 5 min.; quitar el forro del filtro y dejar drenar unos pocos segundos (5 a 10 seg.), antes de removerlo.
7. Si los filtros de las bolsas del stomacher no están disponibles, enjuagar de forma sencilla la bolsa o la jarra estéril y decantar el enjuague a través de papel filtro dentro de otra bolsa o frasco erlenmeyer de 250 mL (si se inocular en baño de agua o en jarra de anaerobiosis), o en termo (para incubador con agitador aerofilico).

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 6 de 30 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Nota: Cuando se analicen alimentos acidificados, tales como; ensaladas de pollo, ajustar el caldo a pH 7.4 con NaOH 2N, después del paso de enjuague.

b) Cola de Langosta o pinzas de cangrejo

Pesar 50 –100 g en una bolsa con filtro y enjuagar como se explicó arriba(literal 7 de preparación de la muestra)

c) Esqueleto completamente descarnado o muestra que no puede ser fácilmente reducido a 25 g (ej: langostas completas, esqueleto de conejo, etc.)

colocar la muestra en una bolsa de 3500mL del stomacher u otro recipiente estéril. Añadir 200mL de agua peptonada 0.1 %. Sellar la bolsa y agitar el contenido durante 2-3 min. Inclinar la bolsa y sostener las piezas de alimentos para permitir que el líquido de enjuague fluya por una esquina de la bolsa. Sanitizar el fondo de la esquina de la bolsa con solución de hipoclorito 1000ppm o etanol al 70 %, luego enjuagar con agua estéril. Asépticamente cortar la esquina de la bolsa y pasar el enjuague a través de embudo de filtro estéril hacia un frasco de 250 mL de centrífuga. Centrifugar a 16000xg por 15 min. Descartar el

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 7 de 30
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

sobrenadante y resuspender el sedimento en 10 mL de agua peptonada 0.1%. Transferir 3 mL de la mezcla de sedimento a 100 mL de caldo

d) Yema, líquida de huevo o mezcla completa de huevo

Dividir la muestra en compuestos de 2 submuestras por compuesto, 25 g por submuestra. Pesar 25 g de cada compuesto en 125 mL de caldo, luego mezclar cuidadosamente, transferir 25 mL de mezcla a otros 100mL de caldo. Analizar ambas diluciones 1:6 y 1:48.

e) Mariscos de descascarar

En general un mínimo de 12 mariscos, deberán ser tomados para obtener una muestra representativa. Dependiendo del tamaño de las especies estas deben proveer un aproximado de 100 a 200 g de compuesto de líquido y carne de mariscos. Recolectar las cantidades apropiadas de líquido y carne de la concha, en una licuadora estéril u otro contenedor apropiado. Licuar a baja velocidad o mezclar en stomacher por 60 seg. Retirar 25 g del marisco homogéneo para análisis de la muestra y colocarla en otra bolsa del stomacher o frasco de 500 mL.

Añadir 225 mL de caldo de enriquecimiento. Transferir 25 mL de la mezcla a un segundo caldo de enriquecimiento de 225 mL. Analizar

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 8 de 30
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

ambos enriquecimientos 1:10 y 1:100

Si los enriquecimientos están siendo incubados en sistema de burbujas dejarlos en recipientes o matraces de 500 mL. Si se incuban

en jarra de anaerobiosis, reducir los volúmenes del frasco / recipiente a 125 mL por división de cada enriquecimiento en 2 partes. El gas no penetra lo suficientemente, en volúmenes más grandes, como para proveer un crecimiento apropiado de *Campylobacter*.

f) Muestra recogida en torundas (Hisopados)

Pipetear 10 mL de caldo de enriquecimiento hacia frascos erlenmeyer estériles de 50 mL con tapón de papel aluminio. Colocar una torunda (Hisopo) con muestra en cada frasco.

Asépticamente separar por completo los palillos debajo de la parte superior del frasco. Reemplazar las cubiertas sueltas. Colocar los frascos en jarra de anaerobiosis. para ajustar las dos tapas de los frascos en jarra, colocar un círculo de cartón sobre la base de la capa del frasco, dejando espacio alrededor del borde del cartón para la circulación del gas.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 9 de 30 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

g) Leche, productos lácteos congelados

Leche cruda de vaca

Instruir al investigador a probar la leche cruda en el sitio de colección, usando una pipeta estéril para colocar la porción de muestra en un papel pH (rango pH 6-8), Si el pH es menor de 7.6 añadir NaOH 1-2N

estéril y generosamente ajustarlo a 7.5 ± 0.2 .

Inmediatamente recibida en el laboratorio probar el pH de la muestra Láctea con papel pH y ajustar a $pH 7.5 \pm 0.2$ con NaOH 1-2N estéril, si es necesario. Centrifugar una porción de 50 g a 20,000x g por 40 minutos. Descartar el sobrenadante y disolver el sedimento (no capa de grasa) en 10 mL de caldo de enriquecimiento. Transferir el sedimento a 90 mL de caldo de enriquecimiento.

Otros tipos de leche y helados:

Ajustar pH como la leche cruda, centrifugar una porción de 50 g a 20,000x g por 40 min. Descartar el sobrenadante y disolver el sedimento (no capa de grasa) en 10 mL de caldo de enriquecimiento. Transferir sedimento a 90 mL de caldo.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 10 de 30
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Helados y otros productos lácteos congelados:

Fundir y asépticamente retirar cualquier dulce u otro sólido antes de pesarlo

Queso:

Pesar 50 g hacia una bolsa de papel filtro y añadir 50 mL de solución de peptona 0.1%. Mezclar en stomacher 15-30 segundos. Retirar e inclinar dejando drenar 5 Segundos y descartar. Centrifugar y remover sedimento al caldo como en la leche cruda.

Media para colar la leche (Pieza de gasa usada para filtrar sólidos durante el ordeñado):

Colocar 5 g de pieza en 100 mL de caldo.

- B. Preenriquecimiento y Enriquecimiento (método modificado por Humprey y Park)

Preenriquecimiento

- a) 4 Horas de preenriquecimiento

Si se conoce que la muestra tiene un tiempo de producción o de recolección entre 10 días, o tiempo de contaminación, o si la muestra es un producto lácteo, preenriquecer a 37°C por 4 horas.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 11 de 30
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

El preenriquecimiento debería ser incubado bajo condiciones microaeróbicas

b) 5 Horas de preenriquecimiento

Se utiliza el método de 5 horas si cualquier producto ha sido refrigerado por un tiempo mayor o igual a 10 días. Toda muestra de agua o de mariscos son preenriquecidas por el método de 5 horas.

Incubar a 30°C por 3 horas, luego por 2 horas. Llevar a cabo la incubación bajo condiciones microaeróbicas.

Este método produce la más grande recuperación para organismos severamente tensionados.

Nota: Incubar microaerobicamente a 30°C al menos que se este usando el sistema de baño de burbuja sin agitación. Enriquecimiento de burbujeo estático a 30 °C, adoptar el crecimiento de anaerobiosis. Información General para ambos métodos

Establecer la velocidad del agitador para el enriquecimiento de burbujeo a 50-60 rpm y a 175-200 rpm para bolsas o frascos gasificados.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 12 de 30
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Enriquecimiento (microaerófilico)

1. Después del preenriquecimiento, ajustar la temperatura en el baño de agua o llevarlo a un incubador a 42 °C.
2. Incubar los enriquecimientos con agitación 23 a 24 horas, excepto las muestras de mariscos, las cuales son incubadas 4 horas adicionales. Las muestras lácteas son incubadas un total de 48 horas.
3. Incubar los enriquecimientos sin agitación 28 a 29 horas, excepto los mariscos, que son incubados un total de 48 horas.

Nota: Las condiciones y tiempo de incubación dependen del tipo de la muestra en análisis.

C. Aislamiento

1. Después de 24 a 48 horas de incubación, estriar los enriquecimientos, ya sea en agares Abeyta-Hunt-Bark (AHB) o agar modificado libre de sangre (CCDA).
2. Hacer una dilución 1:100 (0.1 mL a 9.9 mL de peptona 0.1 %) de cada enriquecimiento y estriar las porciones diluidas y no diluidas.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 13 de 30
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

3. Para muestras de mariscos, huevos, y otros enriquecimientos preparados en diluciones, estriar únicamente de los caldos.
4. Transferir dos asadas de caldo de enriquecimiento a cada placa y luego estriar para el aislamiento.

Nota: Proteger las placas de la luz

5. Colocar las placas en jarras de anaerobiosis (medio llenas si es posible) o en bolsa plástica hermética.
6. Calentar, sellar o cerrar la tapa de la boca de bolsa
7. No demorar en traer las jarras o las bolsas a condiciones microaeróbicas
8. Para jarras usar el método de evacuación / gasificación, sobres campy gas o sobre con una jarra anaeróbica de 9.5 litro BBL.
9. Si se usan bolsas, sujetar una pipeta a ambos, al tubo de gasificación y al tubo de evacuación; con el establecimiento de vacío muy bajo,

evacuar el gas a través de un corte en el ángulo exterior, repetir dos veces y tapar el ángulo exterior para cerrar.

Las bolsas pueden ser usadas con incubador a 42 °C, por 24 a 48 horas.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 14 de 30 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Nota: Cuando se está preparando agar en placa, secar las placas toda la noche sobre una mesa. Si las placas deben ser usadas el mismo día, colocarlas a 42 °C en incubadora por varias horas. Un muy breve tiempo de secado de la superficie inhibirá el crecimiento de ***campylobacter***

D. Identificación

1. Las colonias de ***Campylobacter*** en agar son redondas a irregulares con bordes lisos, pueden mostrar un denso crecimiento blanco traslucido, hasta difundir una membrana de crecimiento transparente
2. Escoger una colonia típica por placa y preparar una tinción; emulsificar colocando en una gota de solución salina o buffer en la lamina
3. Cubrir con un cubreobjeto 22 x 22mm y examinar sin aceite en campo oscuro óptico 63x o con aceite bajo fase de contraste a 1000x
4. Guardar las placas seleccionadas a 4°C bajo condiciones microaeróbicas, si el análisis no se empezara inmediatamente
5. Si es posible comparar con un cultivo de control positivo
6. Las células de ***Campylobacter*** son curvas, 1.5-5mm de largo, generalmente cuando están unidas forman una figura en zigzag (en cualquier dirección). Las células seleccionadas del agar con frecuencia

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 15 de 30 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

7. Demuestran solo una movilidad en “inmersión”, sin embargo las que son seleccionadas del caldo se balancean rápidamente en forma de saca corcho.
8. Aproximadamente el 10 % de las células dañadas no son móviles, las células mas viejas o tensionadas disminuyen su movilidad y pueden mostrar formas cocoides.
9. Usar guantes o lavar las manos y desinfectar el portaobjetos y los lentes después de completar la inmersión.
10. Una dosis infectiva puede adquirirse desde la suspensión de células que se infiltran desde la platina
11. Si los organismos parecen típicos, reestriar a agar Abeyta-Hunt-Bark (AHB), sin antibióticos, dos colonias
12. Confirmar únicamente una placa
13. Elegir la placa con al menos algo de crecimiento
14. Refrigerar las placas de agar de aislamiento microaeróbicamente en el caso que sea necesario, resembrar. Incubar las siembras reestriadas a 42 °C 24-48 horas, microaeróbicamente.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 16 de 30 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

15. Continuar el reestriado las veces que sea necesario para obtener el cultivo puro.

E. Confirmación

Prueba de Oxidasa y Catalasa

1. Realizar las pruebas de catalasa y oxidasa, desde el crecimiento sobre una placa reestriada ABH.
2. Colocar una asada de crecimiento en una gota de H₂O₂ 3%.
3. El burbujeo indica prueba positiva para la catalasa
4. Frotar una asada de crecimiento sobre papel filtro humedecido con reactivo de oxidasa.
5. Si el reactivo se vuelve púrpura, es oxidasa positiva. Todas las especies de ***Campylobacter*** son oxidasa positiva

Nota: Las colonias crecidas sobre placas de agar con carbón vegetal pueden dar una reacción falso-positiva.

Pruebas Bioquímicas

Todas las pruebas incluyen los siguientes controles: ***Campylobacter jejuni*** (para hipurato y otras pruebas).

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 17 de 30 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Tinción al Gram

Preparar la tinción al Gram con una porción de crecimiento sobre la placa. usar fuccina de carbacol 0.5 % (Difco). Los resultados de la contratinción pueden ser aclarados con el rojo de fenol. ***Campylobacter*** es gramnegativo.

Hidrólisis de Hipurato

Emulsificar generosamente 2 asadas de 2mm de crecimiento del reestriado seleccionada de la placa no selectiva o la placa de inhibición de antibiótico a 0.4 mL de solución 1 % de hipurato en tubo de 13 x100 mm. Incubar 2 horas en baño de agua a 37°C.

Añadir 0.2 mL de reactivo de Ninhidrina, agitar y reincubar 10 min. Leer los tubos rápidamente. El color violeta es reacción positiva (no color púrpura pálido o medio).

Si la reacción no es violeta, añadir otros 0.25 mL de ninhidrina a los tubos, si el color no se hace violeta, la reacción es negativa

Si el control de ***Campylobacter jejuni***, es negativo, añadir un extra 0.1-0.2mL de reactivo de ninhidrina a los tubos e incubar otros 10 min. Solo ***Campylobacter jejuni*** es hipurato positivo.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 18 de 30 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Refrigerar la solución de Hipurato hasta 1 mes y la solución de ninhidrina hasta 3 meses.

Reacción de TSI

Abundantemente inocular en agar inclinado y picar el fondo de agar inclinado de TSI desde la placa de agar sangre. Incubar bajo atmósfera microaeróbica a 35-37°C por 5 días. *Campylobacter jejuni* no produce H₂S. Todas las especies de *Campylobacter* producen reacción alcalina. Todas las especies de *Campylobacter jejuni* producen reacciones alcalina/ alcalina. Preparar el agar inclinado no más de 7 días antes de usar.

Prueba de utilización de glucosa

Inocular por picadura 2 tubos de medio OF 3 veces cada tubo de las placas de agar sangre. Un tubo conteniendo glucosa y uno conteniendo solo base. Incubar 4 días bajo atmósfera microaeróbica a 35-37°C.

Todas las especies de *campylobacter*, no utiliza glucosa u otra azúcar y no mostrara cambio en ningún tubo.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 19 de 30 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Pruebas usando inóculo diluido

Emulsificar el crecimiento de las colonias hacia 5 mL de peptona 0.1% y ajustar la turbidez a Macfarland N₀1. Usar esta suspensión para inocular las siguientes pruebas.

Inhibición de Antibiótico

Extender con algodón en una placa de agar Abeyta-Hunt-Bark (AHB), sin antibiótico con la suspensión y una gota de ácido nalidixico y discos de Cefalotina hacia los lados opuestos de la placa. Incubar microaeróbicamente 24-48 horas a 37 °C. Cualquier tamaño de la zona indica sensibilidad.

Crecimiento a temperatura de tolerancia

Usar una asada de cultivo diluido, estriar una línea a través de cada 3 placas de agar Abeyta-Hunt-Bark (AHB) Inocular 4 líneas por placa. Incubar una placa a 25°C, una a 35-37°C, y una a 42 °C bajo atmósfera microaerofílica por 3 días. Mas crecimiento que el inóculo inicial es una prueba positiva.

Crecimiento en medio semisólido modificado

Inocular en la superficie de las siguientes pruebas bioquímicas con 0.1 mL de cultivo diluido, incubar microaeróbicamente todos los medios semisólido a 35-37 °C por 3 días, excepto el medio nitrato, los cuales son

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 20 de 30
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

incubados 5 días. El crecimiento será una escasa banda dibujada justo bajo la superficie.

Glicina 1%. Registra ± crecimiento; NaCl 3.5%. Registra ± crecimiento.

H₂S de cistina

Inocular el medio cistina y suspender una banda de acetato de plomo desde la parte superior, manteniendo la tapa suelta. No dejar que la banda toque el medio; el ennegrecimiento de la banda aun ligeramente es reacción positiva.

Reducción de Nitrato

Después de 5 días añadir los reactivos de nitrato A y B. El color rojo es reacción positiva.

III. CALCULOS

No aplica

IV. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

En la reacción de oxidasa solo la aparición de un color púrpura se reporta como prueba positiva, en cambio en la prueba de hidrólisis de hipurato la aparición de un color violeta, es prueba positiva y la coloración púrpura es

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 21 de 30
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

prueba negativa. En la prueba de H₂S de Cistina el ennegrecimiento de la banda, sea este ligero o pronunciado se considera positivo.

La inhibición de antibiótico cualquier tamaño de la zona de inhibición es prueba positiva

V. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

1. Las muestras deben ser analizadas tan pronto como sea posible para evitar el sobrecrecimiento competidor
2. Se deben de guardar los caldos cubiertos, después de añadir FBP y proteger el agar de la luz durante el almacenamiento y uso.
3. El FBP reacciona rápido con O₂, usar solo concentrado recientemente preparado o congelado. La hemoglobina en sangre, también absorbe O₂ por lo tanto, usar sangre recientemente lisada. Congelar para inhibir reacción con el oxígeno.
4. Se usan medios recientemente preparados o medios que no tengan mas de un mes de preparados, debido a que estos absorben O₂ que pueden generar peróxido.

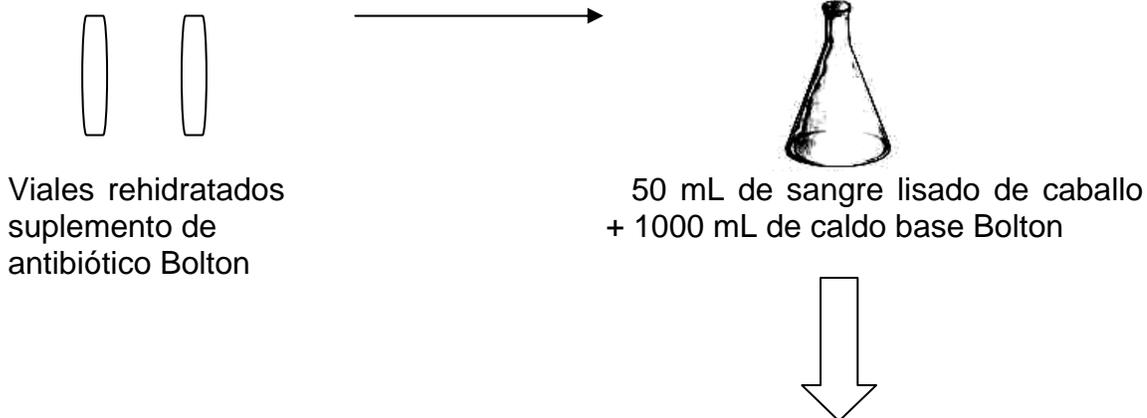
	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 22 de 30 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

5. Los microorganismos son sensibles a las enzimas en los alimentos, por lo tanto, las muestras son lavadas y eliminadas del caldo de enriquecimiento o centrifugadas.

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

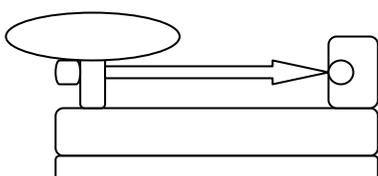
Procedimiento para el Aislamiento e Identificación de ***Campylobacter jejuni***

A. Preparación de la Muestra



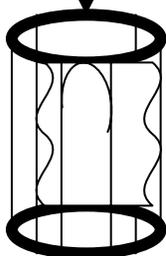
Continúa en página siguiente

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 23 de 30 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

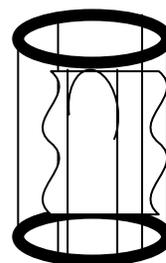


Pesar 25 g de muestra (50 g si es fruta o vegetales)

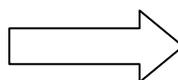
Adicionarlo a la bolsa



Colocar en el colgadero giratorio
Cerrada la boca de la bolsa; agitar
Por 5 min. o en un mezclador a 25 rpm.



Colocar el broche en la boca de la bolsa para prevenir que el forro caiga dentro durante el llenado.



Luego dejar reposar 5 min.
quitar el forro del filtro y
dejar drenar unos pocos
segundos (5 a 10 seg),
antes de removerlo.

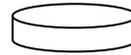
	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 24 de 30 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

B. Preenriquecimiento

Realizarlo mediante el método de 4 o 5 horas de preenriquecimiento dependiendo de la muestra como se explica en el procedimiento estándar. De la misma forma para el enriquecimiento.

Aislamiento

Estriar los enriquecimientos después de 24 –48 horas de incubación



agar Abeyta –
Hunt –Bark (AHB)



agar modificado
libre de sangre
(CCDA).

Hacer dilución 1:100 de los Enriquecimientos (0.1 mL a 9.9 mL de peptona 0.1 %)

Estriar 2 asadas de cada enriquecimiento

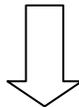


agar Abeyta –
Hunt –Bark (AHB)



agar modificado
libre de sangre
(CCDA).

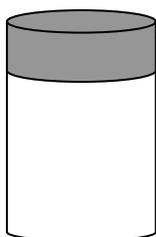
Nota: Proteger las placas de la luz



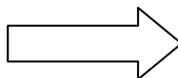
Continúa Pág. Siguiende

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 25 de 30 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

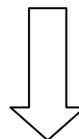
C. Identificación



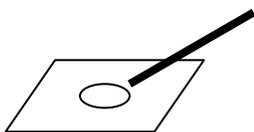
Incubar las placas bajo condiciones microaeróbicas, a 42 °C, por 24 a 48 horas.



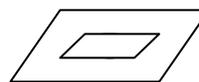
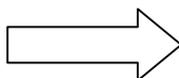
Las colonias en los agares son redondas a irregulares con bordes lisos, pueden mostrar un denso crecimiento blanco traslucido, hasta difundir una membrana de crecimiento transparente.



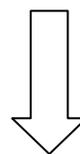
Tinción



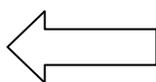
Emulsificar una colonia típica
Con solución salina o buffer



Cubrir con un cubreobjeto
22x22mm



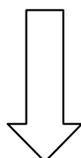
Si es posible comparar con
un cultivo de control positivo



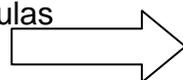
examinar sin aceite en campo
oscuro óptico 63x o con aceite
bajo fase de contraste a 1000x.

Continua Pág. siguiente

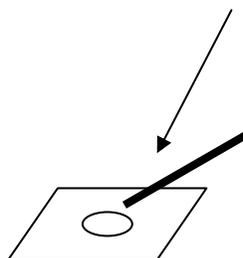
	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 26 de 30 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:



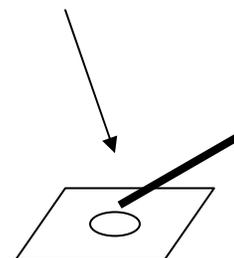
las células de *campylobacter* cuando están unidas forman una figura en zigzag. Las células seleccionadas del agar con frecuencia demuestran solo una movilidad en "inmersión," las que son seleccionadas del caldo se balancean rápidamente en forma de saca corcho.



Prueba de Oxidasa y Catalasa

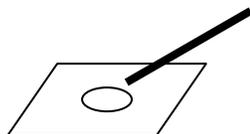


Extender la colonia en una gota de peróxido; produce burbujeo inmediatamente.



Extender la colonia en un papel humedecido con oxidasa; se produce una coloración púrpura

Tinción al Gram



Tomar una porción de la superficie de crecimiento sobre la placa. Usar fucina de carbacol 0.5 % (Difco). Los resultados de la contratinción



Hidrólisis de Hipurato



Emulsificar 2 asadas de 2mm de crecimiento del reestriado seleccionada de la placa no selectiva o la placa de inhibición de antibiótico a



.Continúa Pág. Siguiete

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 27 de 30 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

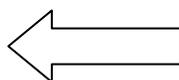
pueden ser aclarados con el rojo de fenol. ***Campylobacter*** es gramnegativo.



0.4 mL de solución 1 % de hipurato en tubo de 13 x100 mm.



Añadir 0.2 mL de reactivo de ninhidrina, agitar y reincubar 10 min. leer los tubos rápidamente. El color violeta es reacción positiva (no color púrpura pálido o medio).



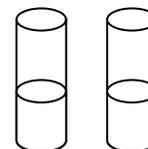
Incubar 2 horas en baño de agua a 37°C.

Reacción de TSI



Inocular en agar inclinado y picar el fondo de agar inclinado de TSI desde la placa de agar sangre. Incubar bajo atmósfera microaeróbica a 35 –37°C por 5 días. ***Campylobacter jejuni*** no produce H₂S. Todas las especies de ***Campylobacter*** producen reacción alcalina.

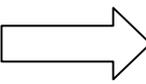
Prueba de utilización de glucosa



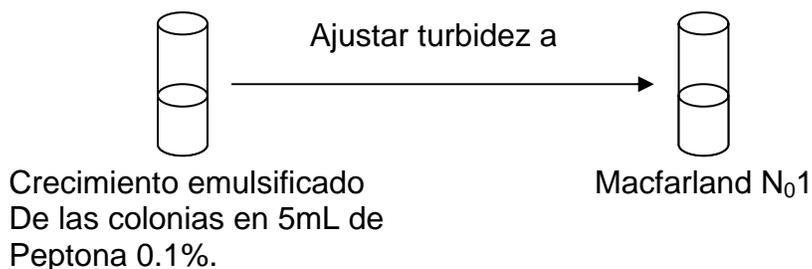
Inocular por picadura 2 tubos de medio OF 3 veces cada tubo de las placas de agar sangre. Un tubo conteniendo glucosa y uno conteniendo solo base.

Continua pag siguiente

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 28 de 30 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

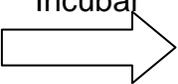

 Incubar 4 días bajo atmósfera Microaeróbica a 35 –37°C.
 Todas las especies de ***Campylobacter***, no utiliza glucosa u otro azúcar y no mostrará cambio en ningún tubo .

Pruebas usando inóculo diluido



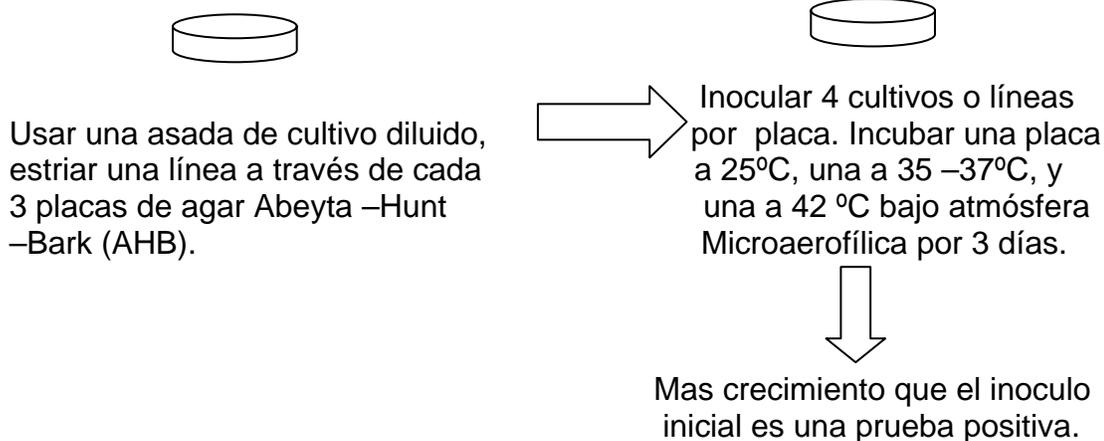
Inhibición de Antibiótico


 Extender con algodón en una placa de agar Abeyta-Hunt-Bark (AHB), sin antibiótico con la suspensión y una gota de ácido nalidixico y discos de Cefalotina hacia los lados opuestos de la placa.

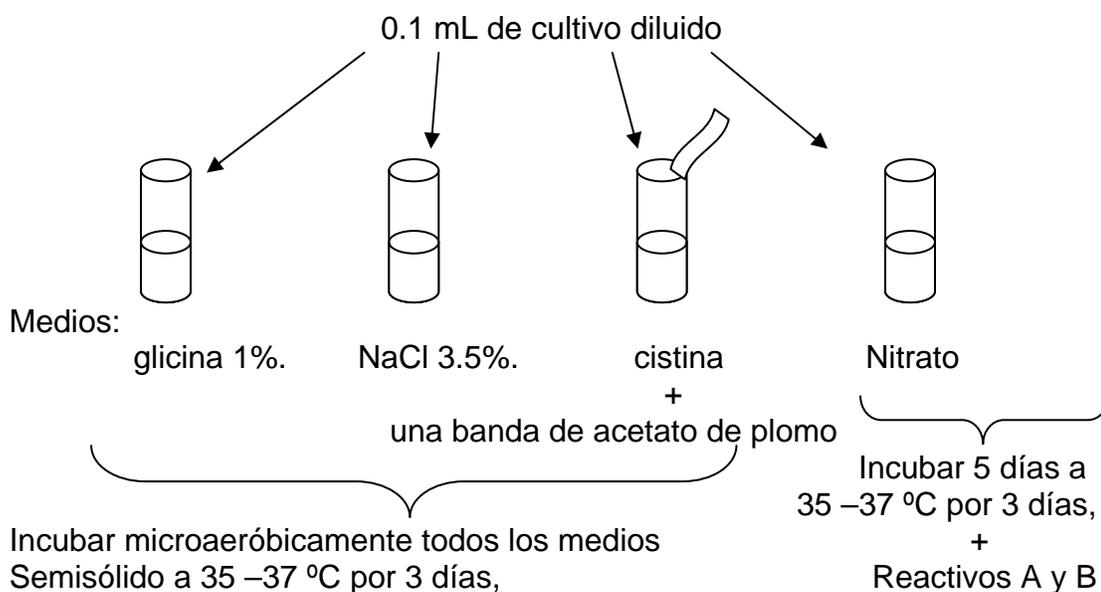

 Incubar microaeróticamente 24 –48 horas a 37 °C. Cualquier tamaño de la zona indica sensibilidad

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 29 de 30 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Crecimiento a temperatura de tolerancia

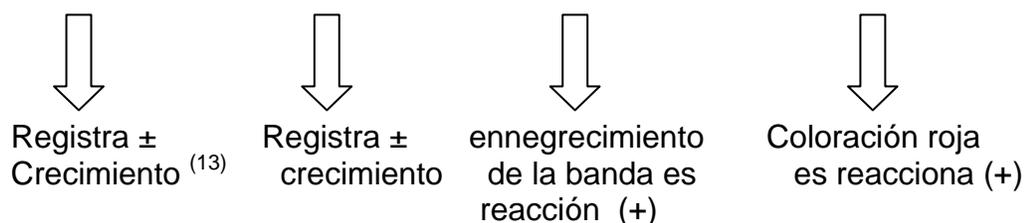


Crecimiento en medio semisólido modificado



Continúa Pág. siguiente

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 04
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Campylobacter jejuni</i>	Página 30 de 30
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:



H. BIBLIOGRAFIA Y/O DOCUMENTOS DE REFERENCIA

Bacteriological Analytical Manual on line FDA; noviembre 2001

Official Methods of Analysis of the AOAC, cuarta edición, 1984,

I. ANEXOS

Tabla de Resultados de Pruebas Bioquímicas

Prueba o reacción	<i>Campylobacter jejuni</i>
Movilidad en tinción	+ 81%
Oxidasa	+
Catalasa	+
Tinción al Gram	Gram (-)
H ₂ S TSI	(-) K/K
Hidrólisis de hipurato	+
Crecimiento a 25°C	-
Crecimiento a 35-37 °C	+
Crecimiento a 42°C	+
Reducción de nitrato	+
Utilización de glucosa	-
Tira de acetato de plomo	+
3.5% de NaCl	-
Crecimiento en 1% de glicina	+
Resistencia a ácido nalidixico	Sensible

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 05
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Vibrio vulnificus</i>	Página 1 de 15
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento utilizado por el laboratorio microbiológico de alimentos para el aislamiento y recuento de *Vibrio vulnificus*.

B. ALCANCE

Este procedimiento se aplica principalmente a las muestras de mariscos para las que se le solicite el análisis

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Vibrio vulnificus: Es una bacteria que puede causar infección grave en heridas, bacteremia y tal vez gastroenteritis ^(16.)

G: verde; Y: amarillo; KA: alcalino- ácido; V: reacción variable; S: sensible

Pescado: Pez comestible que ya ha sido sacado del agua.

Mariscos: Animal marino invertebrado, especialmente el crustáceo o molusco comestible. Crustáceos: Clase de animales articulados, de articulación branquial y tegumento sólido, cubiertos con un caparazón calizo ej: cangrejo, langosta, camarón, cochinilla ⁽¹⁰⁾.

D. POLITICAS

1. El analista cumple estrictamente con el procedimiento descrito en el manual de procedimientos

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 05
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Vibrio vulnificus</i>	Página 2 de 15
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

2. Verificar del ambiente y el funcionamiento del equipo y materiales, antes de iniciar el análisis.
3. Los medios de cultivo utilizados en el análisis son los especificados en el procedimiento
4. Los resultados de los análisis son confidenciales y específicos para el cliente que lo solicita.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista aplicar el procedimiento según la naturaleza de la muestra.

F. REGISTROS DE CALIDAD

Para llevar a cabo el procedimiento de análisis se proponen los siguientes documentos:

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de la muestra	Secretaria y Profesional encargado
Protocolo del analista	Profesional encargado
Limpieza y sanitización del área de trabajo	Auxiliar de laboratorio
Monitoreo ambiental	Profesional encargado
Fichas técnicas (preparación de reactivos y medios de cultivos)	Auxiliar de laboratorio
Resultados de análisis	Profesional encargado

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 05
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Vibrio vulnificus</i>	Página 3 de 15
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

G. DESAROLLO

I. INTRODUCCION

Diversos estudios realizados en muestras representativas de alimentos marinos, recolectados de restaurantes o marisquerías han revelado, invariablemente, la presencia de bacilos marinos halofílicos gramnegativos correspondientes a la familia vibrionaceae, al género *Vibrio vulnificus*. Esta especie es autóctona del agua de mar y representa factores de riesgo para el desarrollo de diferentes síndromes clínicos en el humano; como el desarrollo de gastroenteritis aguda, septicemia primaria, infección del oído, o infección de heridas.

Las causas que con mayor frecuencia contribuyen a la aparición de casos y brotes en la población, incluyendo el consumo de productos del mar crudos, marinados sin calor, parcialmente cocidos, la contaminación de los alimentos marinos por parte del manipulador, mediante el mecanismo mano- alimento, por ser un portador.

II. EQUIPO, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Equipo y Materiales

- a) Asas estériles
- b) Erlenmeyer de 500mL

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 05
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Vibrio vulnificus</i>	Página 4 de 15
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

c) Incubador

d) Licuadora

e) Microscopio

f) Palillos estériles

g) Pipetas estériles

h) Placas de petri

i) Tubos para diluciones

Medios de cultivo y Reactivos

a) Agar gelatina (GA)

b) Agar inclinado de Glucosa Arginina (AGS)

c) Agar modificado celubiosa –polimixinaB-Colistina (mCPC)

d) Agar sal gelatina (GS)

e) Agar Tiosulfato- citrato-bilis- sal-sucrosa (TCBS)

f) Agar triple azúcar hierro (TSI)

g) Agar triptona 1%, NaCl 1% (T₁N₁)

h) Agar triptona 1%, NaCl 2% (T₁N₂)

i) Agua peptonada alcalina (APW)

j) Buffer Fosfato salino (PBS)

k) Caldo peptona sal alcalino (APS)

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 05
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Vibrio vulnificus</i>	Página 5 de 15
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

- l) Discos 10 y 150 µg O/129 (2,4- diamino-6,7diisopteridina)
- m) Reactivo para la prueba OPNG o discos comercialmente disponibles
- n) Reactivo de prueba de oxidasa
- o) Medio para la prueba de movilidad semisólido
- p) Solución de baño para el ensayo enzima inmune(EIA)

III. PROCEDIMIENTO

Muestra

Pescado: Superficie de tejidos, vísceras o agallas.

Mariscos: Contenido interno del animal; reunir de 10 a 12 animales; homogenizar y retirar 50 g de la mezcla para muestra en prueba.

Crustáceos: Animal completo; si es posible, o la porción central del animal, incluyendo agallas y vísceras.

A. Preparación de la muestra en ensayo

Preparar asépticamente la dilución 1:10 con 50 g de muestra en 450 mL de Solución buffer fosfato (PBS) a pH 7.2 - 7.5; licuando por 2 min a velocidad alta en licuadora estéril

B. Enriquecimiento

1. Preparar originalmente agua peptonada alcalina (APW) y 10 diluciones reguladas en PBS; pH 7.2 – 7.5

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 05
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Vibrio vulnificus</i>	Página 6 de 15
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

2. Inocular una serie de tubos en NMP; añadir porciones de 1mL de cada dilución en una serie de 3 tubos conteniendo 10 mL de agua alcalina peptonada.

3. Incubar los tubos a 35-37°C por 12-16 horas.

Nota: Las inoculaciones de los tubos NMP deben ser completados entre 15-20 min. de la preparación de la dilución

C. Aislamiento

1. No agitar los tubos después de la incubación porque todas las diluciones contienen un tubo con turbidez.
2. Estriar en agar TCBS de cada tubo de caldo de enriquecimiento tomando una asada 1 cm. debajo de la superficie del caldo. (Incubar a 35-37°C por 18-24 horas).
3. De igual manera estriar sobre agar mCPC (incubar a 39-40°C por 18-24 horas)
4. Inocular de los cultivos anteriores en caldo de agua alcalina peptonada para verificar daño en *Vibrio vulnificus* sobre las placas TCBS y mCPC como controles para pruebas posteriores.

D. Identificación de Colonias Típicas

1. Examinar los agares TCBS y mCPC para identificar colonias típicas de *Vibrio vulnificus*.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 05
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Vibrio vulnificus</i>	Página 7 de 15
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

2. Picar tres o más colonias típicas o sospechosas de cada medio.
3. Inocular sectores de las placas Agar Gelatina GA y Agar Sal de Gelatina GS
4. Estriar en agar T₁N₂ o TSA + 1.5% NaCl. (concentración final 2% NaCl) para aislar; incubar a 35-37°C por 14 –18 horas.

Otros medios de comparación o el medio Agar Inclinado Arginina Glucosa AGS pueden ser inoculados al mismo tiempo.

Resultados Esperados de Pruebas Presuntivas

En agar TCBS el *Vibrio vulnificus*, colonias redondas, de 2-3 mm de diámetro, verdes a azul verdoso. Algunas colonias de *V. vulnificus* son más grandes y amarillas (ácido producido por la fermentación de la sucrosa)

En agar mCPC las colonias de *V. vulnificus* son planas y amarillas (ácido producido por la fermentación de la celubiosa), con centros opacos y periferia traslucida, aproximadamente de 2 mm de diámetro. Esta es una identificación presuntiva de *Vibrio vulnificus*.

Procedimiento para Identificación Bioquímica

Prueba de Oxidasa

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 05
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Vibrio vulnificus</i>	Página 8 de 15
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

1. Usar el crecimiento de una placa con medio no fermentador de carbohidratos para prueba de oxidasa.
2. Colocar 2 o 3 gotas de reactivo de la prueba de Oxidasa sobre el crecimiento bacterial
3. También se puede transferir una pequeña cantidad de crecimiento con un moldadiente estéril o asa de platino a un papel filtro humedecido con reactivo oxidasa (no usar asas de níquel crómico.).
4. Un color azul oscuro se desarrollará rápidamente (entre 2 mm) para reacción positiva.

Medio de Prueba de Movilidad

1. Pulsar el inóculo en el centro y a $\frac{2}{3}$ de profundidad de medio de la prueba de movilidad.
2. Incubar de 18 a 24 horas a 35 –37 °C.
3. Una difusión circular de crecimiento del crecimiento bacterial desde la línea de la punzada, es una prueba positiva para *Vibrio vulnificus* .

Medio inclinado Arginina Glucosa (AGS)

1. Estriar la superficie inclinada y por picadura el fondo del medio AGS.
2. La reacción típica de *V. vulnificus* es alcalino (color púrpura) en la superficie inclinada y ácido en el fondo (color amarillo).

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 05
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Vibrio vulnificus</i>	Página 9 de 15
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Triple azúcar hierro (TSI):

Estriar en la inclinación y picar hacia el fondo del agar TSI; *V. vulnificus* generalmente produce una inclinación alcalina (rojo). Usar este u otro medio que contenga lactosa como fuente del inóculo para la prueba OPNG.

Sensibilidad Vibriostática O/129

Colocar los discos sobre el área densamente estriada de una placa de aislamiento (TSA con una concentración final de NaCl al 2%). Usar los discos que contengan 10µg y 150 µg de vibriostática O/129. *Vibrio vulnificus* es sensible a 10 µg de O/129. Los discos están comercialmente disponibles o pueden ser preparados en el laboratorio. Alternativamente, usar agar TSA conteniendo 10-150µg de O/129 por mL. Prueba OPNG

Realice la prueba OPNG usando una porción de cultivo del TSI u otro medio que contenga lactosa. Usar convencionalmente el tubo de prueba preferido o los discos comercialmente disponibles. *V vulnificus* es OPNG –Positivo.

IV. CALCULOS

No aplica

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 05
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Vibrio vulnificus</i>	Página 10 de 15
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

V. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

En la prueba de oxidasa el desarrollo de una coloración azul es prueba positiva, siempre que no se haya utilizado una asa de níquel cromo. La movilidad se reporta positiva siempre que la difusión bacteriana en el medio sea circular

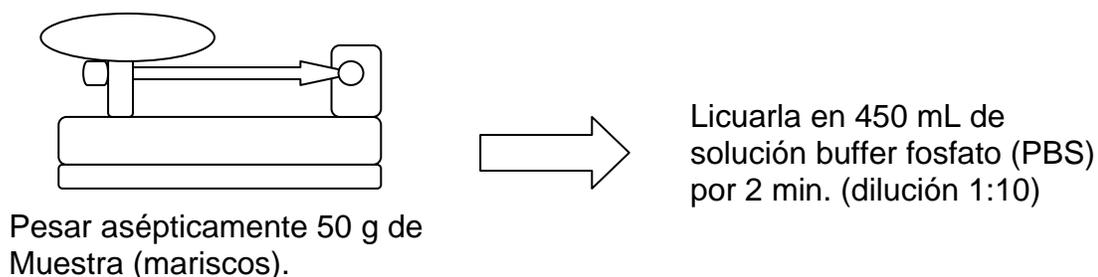
VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

1. Desarrollar los análisis bajo todas las medidas de higiene y seguridad durante todo el procedimiento
2. Verificar el buen funcionamiento de equipo y materiales antes de iniciar el procedimiento de análisis

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

A. Aislamiento e Identificación de *Vibrio vulnificus*

Preparación de la muestra

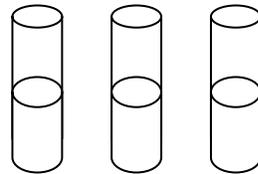
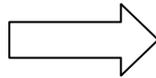


	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 05
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Vibrio vulnificus</i>	Página 11 de 15
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

B. Enriquecimiento



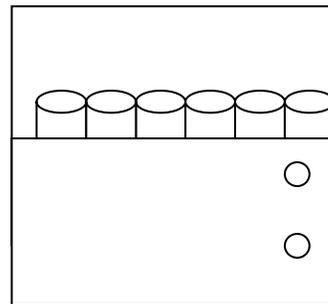
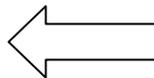
Preparar 10 diluciones con Agua alcalina peptonada (APW) Reguladas a pH 7.2 a 7.5 con PBS.



Añadir 1 mL de cada dilución en una serie de 3 tubos con 10 mL de APW



Nota: La inoculación de los tubos NMP debe ser completada entre 15 a 20 min de la Preparación de la dilución.

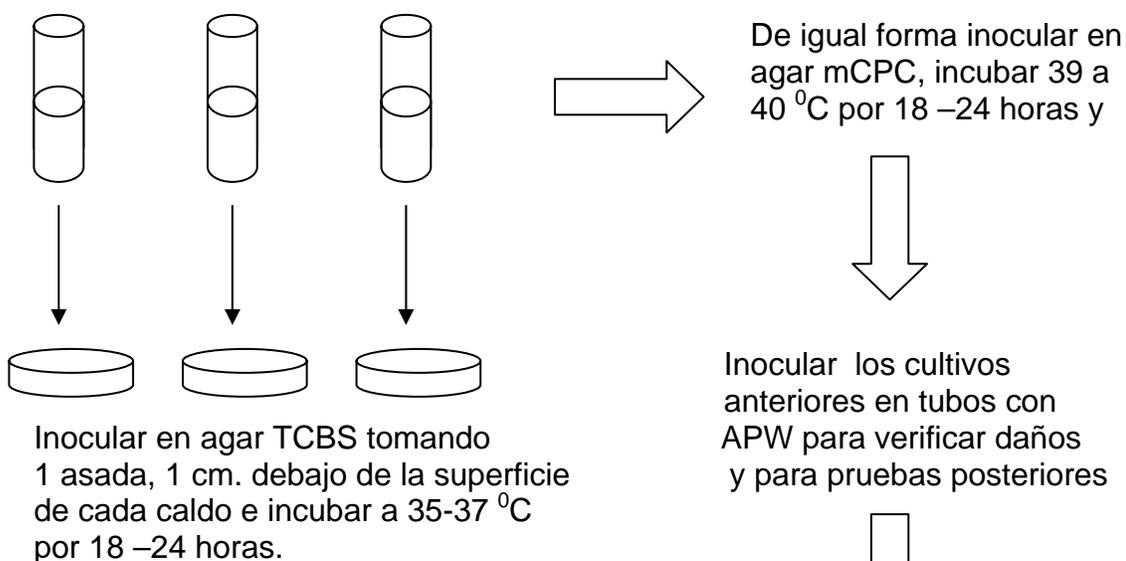


Incubar a 35 a 37 °C por 12 a 16 horas.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 05
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Vibrio vulnificus</i>	Página 12 de 15 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

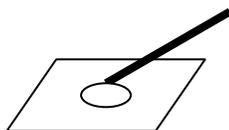
C. Aislamiento

No agitar los tubos.



IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

Prueba de oxidasa



colocar crecimiento de la placa en papel humedecido con reactivo oxidasa.

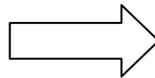
Picar 3 colonias típicas de Cada placa e inocular en sectores en placas de agar gelatina GA y sal gelatina GS. Estriar también en agar T₁N₂ o en agar TSA + 1.5 % de NaCl incubar a 35 –37 °C por 14 –18 horas.



	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 05
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Vibrio vulnificus</i>	Página 13 de 15
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Prueba de movilidad

coloración azul oscuro reacción positiva.

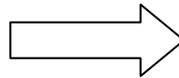


Inocular crecimiento e incubar a 35 -37°C por 18 -24 horas.

Agar triple azúcar hierro TSI



Inocular desde el fondo y Estriar en la superficie

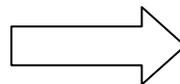


Coloración roja es reacción Positiva.

Medio inclinado Arginina Glucosa (AGS)



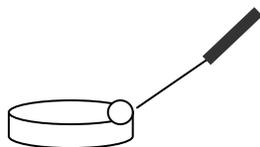
Estriar la superficie inclinada y por Picadura el fondo del medio.



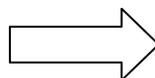
Coloración púrpura en la Superficie (alcalino) y amarillo en el fondo (ácido) es reacción positiva.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 05
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Vibrio vulnificus</i>	Página 14 de 15
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Sensibilidad Vibriostatica O/129



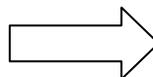
Colocar los discos que contengan 10 a 150 μg de vibriostatico O/129 en las zonas densamente estriada de la placa de TSA concentración final NaCl 2%.



Vibrio vulnificus es Sensible a 10 μg de O/129.

Prueba OPNG

Usar una porción de cultivo de TSI u otro medio que contenga lactosa. Usar convencionalmente el tubo de prueba preferido o los discos comercialmente disponibles ⁽¹⁵⁾.



V. vulnificus es OPNG – Positivo.

H. BIBLIOGRAFIA Y/O DOCUMENTOS DE REFERENCIA

Bacteriological Analytical Manual on line FDA; noviembre 2001 Oficial Methods of Analysis of the AOAC, cuarta edición, 1984, Pág. 129 a 134

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 05
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Vibrio vulnificus</i>	Página 15 de 15
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

I. ANEXOS

Tabla de Resultados de Pruebas Bioquímicas

PRUEBA O SUSTRATO	REACCION DE <i>Vibrio vulnificus</i>
Agar TCBS	G
Agar mCPC	KA
Medio AGS	Y
NaCl 0%	-
NaCl 3%	+
NaCl 6%	+
NaCl 8%	-
NaCl 10%	-
Crecimiento a 42 °C	+
Sucrosa	-
D- Celubiosa	+
Lactosa	+
Arabinosa	-
D- manosa	+
D- manitol	V
Oxidasa	+
OPNG	+
Voges proskauer	-
10 µg 0/129	S
150 µg 0/129	S
Tinción al Gram	Gram (-)
Movilidad	Móvil
TSI	K/A raras veces A/A

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 06
	RECuento DE MOHOS Y LEVADURAS.	Página 1 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento que el laboratorio Microbiológico de alimentos utiliza para el recuento de mohos y levaduras mediante el método vertido en la placa.

B. ALCANCE

Este procedimiento es aplicable a todo tipo de alimentos para consumo humano, en el que se necesite determinar la presencia de mohos y levaduras.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Moho: Es un hongo que se encuentra tanto en el aire libre como en interiores, el moho, crece mejor en condiciones cálidas, mojadas y húmedas, y se propaga y reproduce mediante esporas. .

Levadura: Hongos que generalmente no son filamentosos, sino unicelulares, de forma ovoide o esferoide que se reproducen por gemación o por fisión (12).

D. POLÍTICAS

1. Los resultados de los análisis son confidenciales y específicos para el cliente que lo solicita.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 06
	RECuento DE MOHOS Y LEVADURAS.	Página 2 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

2. Los materiales y reactivos utilizados son de la mejor calidad y los apropiados para los análisis.
3. Procedimientos de análisis deberán encontrarse al alcance de todo profesional encargado involucrado en el desarrollo del análisis.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista cumplir con el procedimiento descrito según la naturaleza de la muestra.

F. REGISTROS DE CALIDAD.

Para llevar a cabo el procedimiento de análisis se proponen los siguientes documentos:

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de la muestra	Secretaria y Profesional encargado
Protocolo del analista	Profesional encargado
Limpieza y sanitización del área de trabajo	Auxiliar de laboratorio
Monitoreo ambiental	Profesional encargado
Fichas técnicas (preparación de reactivos y medios de cultivos)	Auxiliar de laboratorio
Resultados de análisis	Profesional encargado

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 06
	RECuento DE MOHOS Y LEVADURAS.	Página 3 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

G. DESARROLLO.

I. INTRODUCCIÓN.

Los hongos son un grupo diverso de organismos unicelulares que se alimentan mediante absorción directa de nutrientes.

La mayoría de hongos están constituidos por finas fibras que contienen protoplasma, llamadas hifas. Los hongos se reproducen por esporas, diminutas partículas de protoplasma rodeado de pared celular. Los tipos más comunes de mohos son: ***Cladosporium***, ***Penicillium***, ***Alternaria***, ***Aspergillus***, ***Mucor***.⁽¹⁶⁾

II. EQUIPO, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Equipos y Materiales.

- a) Balanza
- b) Baño de agua
- c) Botellas con tapadera de rosca para diluciones.
- d) Cajas de petrí estériles
- e) Cuenta colonias Québec.
- f) Microscopio.
- g) pH-metro.
- h) Pipetas graduadas estériles

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 06
	RECuento DE MOHOS Y LEVADURAS.	Página 4 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

i) Pipeteadores.

j) Stomacher

Medios de Cultivo y Reactivos.

- a) Agar dicloro glicerol 18%
- b) Agar cloranfenicol dicloro rosa bengal
- c) Agar de malta
- d) Agar de papa dextrosa (PDA)
- e) Agua peptonada 0.1%.

III. PROCEDIMIENTO

RECuento DE MOHOS Y LEVADURAS POR LA TÉCNICA DE DILUCIÓN EN PLACA

A. Preparación de la muestra

1. Pesar 25 a 50 g de la muestra,
2. Añadir cantidad apropiada de agua peptonada 0.1% a la muestra pesada para obtener una dilución 10^{-1} ,
3. Homogenizar en stomacher por 2 min.
4. Hacer diluciones hasta 10^{-6}

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 06
	RECuento DE MOHOS Y LEVADURAS.	Página 5 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Método del extendido en placa:

Asépticamente pipetear 0.1 mL de cada dilución sobre placas conteniendo agar cloranfenicol dicloro rosa bengal y extender con una varilla doblada estéril. Hacer cada dilución por triplicado

Método de vertido en placa:

1. Mediante pipeta estéril con tapón de algodón transferir 1 mL de las diluciones a una caja de petri e inmediatamente agregar 20 a 25 mL de agar dicloro glicerol 18%
2. Mezclar suavemente en el sentido de las agujas del reloj y luego en sentido inverso cuidando que no se derrame en la tapadera de la caja
3. Después de añadir la muestra, añadir el agar en un tiempo no mayor a 1 ó 2 min, pues de lo contrario la dilución se adhiere en el centro de la caja (especialmente si tiene alto contenido de almidón y si la caja es plástica) y puede que no se mezcle uniformemente.
4. Llevar cada dilución por duplicado. No debe pasar mas de 20 min (o preferiblemente 10 min.) entre la preparación de la primera a la ultima dilución

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 06
	RECuento DE MOHOS Y LEVADURAS.	Página 6 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Nota: El método del extendido es considerado mejor que el de vertido en placa

5. Incubar las placas en la oscuridad a 25°C. No colocar las placas en filas de más de 3 y no invertirlas.

Nota: Las placas deben permanecer sin moverse hasta el recuento.

B. Recuento de las placas:

1. Contar el crecimiento en las placas después de 5 días de incubación
2. Sino ha habido crecimiento reincubar por otras 48 horas. Contar las cajas conteniendo 10 a 150 colonias. Si no hay levaduras, las cajas con 150 colonias son usualmente contables. Sin embargo, si la cantidad de mohos es grande dependiendo del tipo de moho, el límite superior contable puede ser disminuido a consideración del analista
3. Reportar las colonias en unidades formadoras de colonias (UFC/g) o (UFC/mL) basadas en el promedio del las placas
4. Aislar las colonias individuales en agar papa dextrosa o agar de malta si se hacen posteriores análisis o si se necesita identificar especies

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 06
	RECuento DE MOHOS Y LEVADURAS.	Página 7 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

IV. CALCULOS

Para reportar el resultado:

Si el tercer dígito es 6 o mayor, se aproxima al siguiente dígito (ej: 456=460).

Si el tercer dígito es 5, aproximarlos al dígito inferior, si el primero de los dígitos es aun menor (ej: 444=440) y aproximarlos arriba si es igual o mayor que 5 (ej: 455=460).

Si las placas de todas las diluciones, no presentan colonias, reportar como menor de 1, la dilución menor utilizada.

V. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Aplica lo explicado en como reportar los resultados del recuento en la parte de cálculos

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL ANÁLISIS

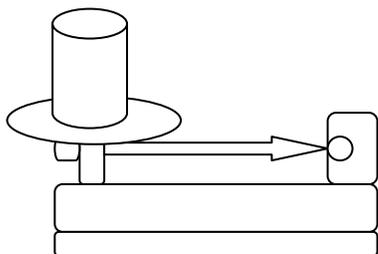
1. Después de incubar en el medio agar dicloro glicerol 18%, las cajas de petri deben quedar selladas para evitar que se introduzcan en ellas hongos del ambiente.
2. Todos los utensilios y recipientes necesarios para pesar la muestra deben encontrarse completamente estériles y evitar falsos positivos.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 06
	RECuento DE MOHOS Y LEVADURAS.	Página 8 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

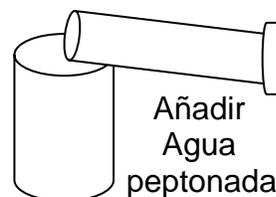
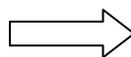
3. No contar las colonias antes del periodo de incubación porque el manejo de las cajas da lugar a la formación de colonias secundarias, invalidando el contaje final.

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

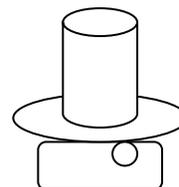
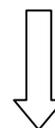
A. Recuento de mohos y levaduras en alimentos método: placa vertida



Pesar asépticamente 25-50 g de Muestra.



Dilución 1:10



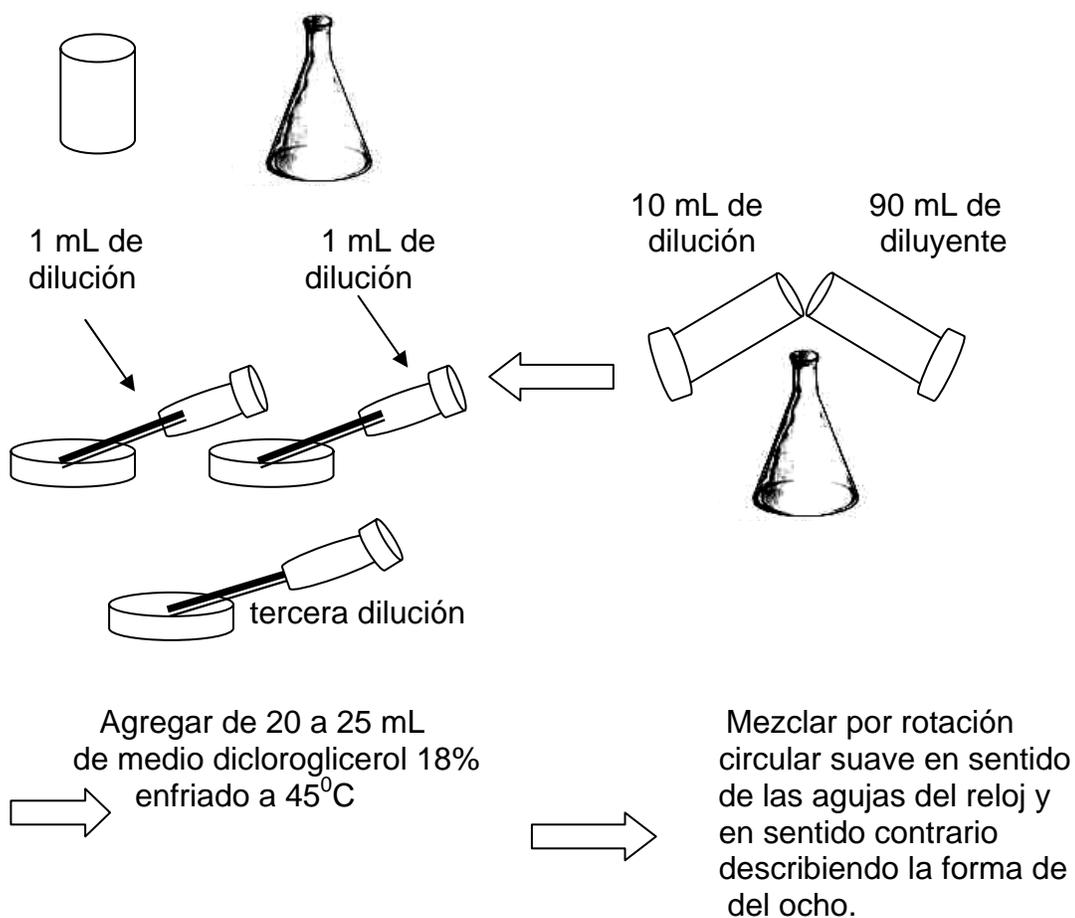
Homogenizar 2 min



Continúa Pág. Siguiende

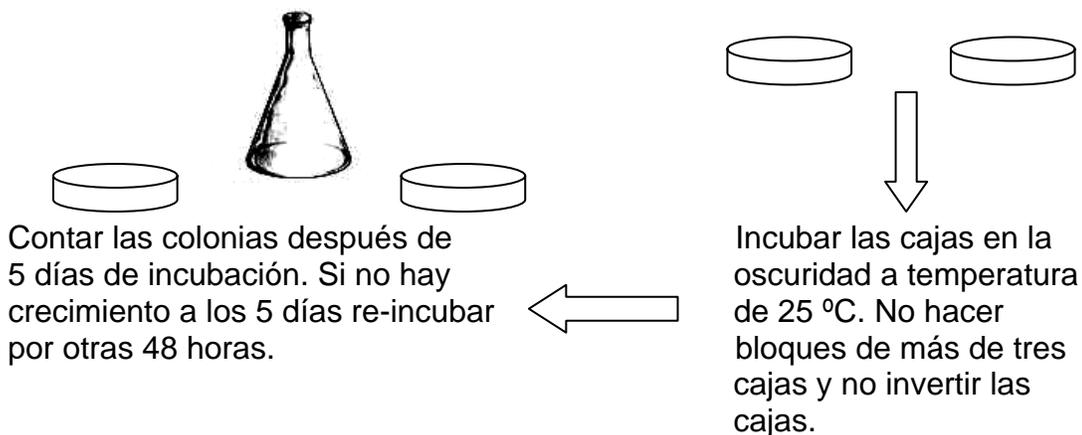
	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 06
	RECuento de MOHOS Y LEVADURAS.	Página 9 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Método en Placa Vertida

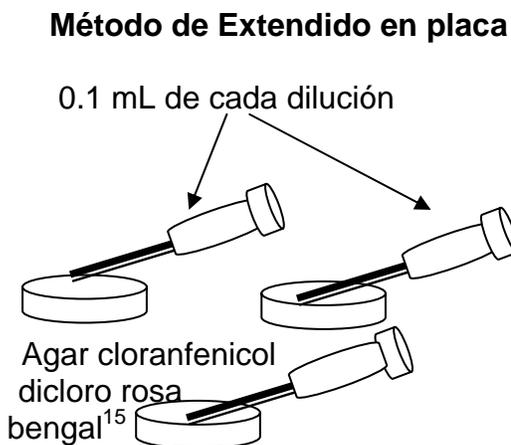


Continúa Pág. siguiente

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 06
	RECuento DE MOHOS Y LEVADURAS.	Página 10 de 10 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:



Contar las cajas conteniendo de 10 a 150 colonias. Si no hay levaduras las cajas con 150 colonias son usualmente contables. Sin embargo, si la cantidad de mohos es grande, dependiendo del tipo de moho, el limite superior contable puede ser disminuido a consideración del analista



H. BIBLIOGRAFÍA Y/O DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA.

Bacteriological Analytical Manual, FDA 8ª Edición, Revisión A, 1998.
Capitulo 18, edición actualizada 24 de octubre de 2001.

I. ANEXOS

No aplica

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 07
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i>	Página 1 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

A. OBJETIVO

Dar a conocer el procedimiento que el laboratorio microbiológico de alimento utiliza para el aislamiento, identificación y cuantificación del ***Staphylococcus aureus***.

B. ALCANCE

El presente procedimiento puede utilizarse en cualquier clase de alimentos que se necesita analizar.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Toxina : Sustancia nociva o toxica que es formada o elaborada como parte integral de una célula o tejido como un producto extracelular (exotoxina) o como una combinación de los dos, durante el metabolismo y crecimiento de ciertos microorganismos y algunas plantas y especies animales superiores.

Catalasa: Hemoproteína que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno.

Plasma: Porción líquida no celular de la sangre circulante, que se distingue del suero obtenido después de la coagulación⁽²⁵⁾

D. POLÍTICAS

1. Los resultados de los análisis son confidenciales y específicos para el cliente que lo solicita.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 07
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i>	Página 2 de 17 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

2. Procedimientos de análisis deberán encontrarse al alcance de todo profesional encargado involucrado en el desarrollo del análisis.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista aplicar el procedimiento según la naturaleza de la muestra.

F. REGISTROS DE CALIDAD

Para llevar a cabo el registro de análisis se propone los siguientes documentos:

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de la muestra	Secretaria y Profesional encargado
Protocolo del analista	Profesional encargado
Limpieza y sanitización del área de trabajo	Auxiliar de laboratorio
Monitoreo ambiental	Profesional encargado
Fichas técnicas (preparación de reactivos y medios de cultivos)	Auxiliar de laboratorio
Resultados de análisis	Profesional encargado

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 07
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i>	Página 3 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Staphylococcus es una bacteria que produce una toxina que causa vómitos al poco tiempo de ser ingerida.

Origen: alimentos cocinados con alto contenido de proteínas ejemplo: jamón cocido, ensaladas, productos de pastelería, y productos lácteos ⁽¹³⁾.

II. EQUIPO, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.

Equipo y Materiales

- a) Asas bacteriológicas
- b) Balanza
- c) Cajas de petri estériles
- d) Cuentan colonias Québec
- e) Cuchillos, cucharas y tenedores estériles
- f) Erlenmeyer
- g) Extendedores de vidrio estériles
- h) Incubador
- i) Licuadora
- j) Phimetro
- k) Pipetas graduadas estériles
- l) Probetas estériles
- m) Recipientes o tubos con rosca

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 07
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i>	Página 4 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

n) Stomacher

o) Tubos de ensayo

Medios de Cultivo

a) Agar tríptico de soya

b) Agua bufferada de fosfato de Butterfield

c) Caldo infusión cerebro corazón

d) Medios Baird Parker

e) Medio de fermentación de carbohidrato (0.5% de glucosa)

f) Medio de fermentación de carbohidratos (0.5% de manitol)

g) Parafina líquida estéril

h) Peroxido de Hidrógeno 3 %

i) Plasma de conejo con EDTA

j) Reactivos de la coloración al Gram

II. PROCEDIMIENTO

A Preparación de la Muestra

1. Recolectar de cualquier cantidad de alimentos, 10 submuestras de 8 onzas (o envasar en pequeñas porciones) al azar. No fragmentar o cortar los envases más grandes de las porciones pequeñas para obtener una submuestra de 8 onzas.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 07
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i>	Página 5 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

- Recolectar las porciones pequeñas como submuestra aun si es mas grande de 8 onzas

Preparación de diluciones

- Para todo alimento difícil de partir a la mitad, piezas grandes y alimentos secos.

- Añadir 450 mL de dilución de buffer fosfato de Butterfield a un recipiente mezclador que contenga 50 g de la unidad analizada
- Licuar 2 minutos. Esta es la dilución 10^{-1} .
- Hacer diluciones rápidamente del homogenizado original, usando pipetas que distribuyan los volúmenes exactamente requeridos. No verter menos del 10% del volumen total de la pipeta por ej: para verter 0.1 o 1mL no utilizar pipetas de volumen mayor de 1 mL o 10 mL respectivamente.
- Preparar todas las diluciones decimales con 90 mL del diluyente más 10 mL de la dilución original.
- Agitar todas las diluciones vigorosamente 25 veces en arco de 30 cm. por 7 seg. No deben transcurrir más de 15 min. desde el mezclado de la muestra hasta que todas las diluciones estén en el medio adecuado.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 07
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i>	Página 6 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

b) Carne dura de dividir a la mitad y piezas más grandes

1. Asépticamente pesar 50 g de la muestra en recipiente con tapón de rosca.
2. Añadir 50 mL de diluyente y seguir como en el literal anterior
3. Agitar 50 veces en arco de 30 cm., para resuspender la mezcla justo antes de hacer la serie de diluciones e inoculaciones.

c) Alimentos secos

Asépticamente pesar 10 g de muestra en un recipiente con rosca estéril. Añadir 90 mL de diluyente (ver literal a)-1) y agitar vigorosamente 50 veces en arco de 30 cm para obtener la dilución 10^{-1} . dejar reposar 3-5 min. y agitar 5 veces en arco de 30 cm para resuspender solo antes de hacer la serie de diluciones e inoculaciones.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 07
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i>	Página 7 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Aislamiento y Cuantificación

1. Transferir de cada dilución efectuada, 1 mL a 3 placas con medio Baird Parker, distribuyendo el mL de la forma siguiente 0.4 mL, 0.3 mL, y 0.3 mL.
2. Con el extendedor de vidrio estéril, extender el inóculo sobre la superficie del medio.
3. Dejar en reposo 10 minutos para que penetre el inóculo en el agar, en caso de no hacerlo, colocar durante 1 hora las placas; dentro de la incubadora
4. Luego invertir las placas, e incubar 45 a 48 horas a 35 °C
5. Transcurrido el tiempo, examinar las placas, observando sus colonias, principalmente, aquellas que tengan 20 a 200 colonias. Las colonias típicas son circulares, lisas, convexas, húmedas, 2 a 3 mm de diámetro grises a negro azabache, con un margen coloreado, rodeado por una zona opaca y frecuentemente con una zona externa clara; las colonias tienen consistencia cremosa a gomosa cuando se toca con la aguja de inoculación

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 07
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i>	Página 8 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

6. Contar y reportar el dato de las colonias. Si se observan varios tipos de colonias típicas de ***S. aureus*** sobre las placas seleccionadas, contar el número de colonias de cada tipo y reportar el conteo por separado. Reportar el dato como número de ***S. aureus*/g** de alimento analizado

Nota: Generalmente en varios alimentos y productos lácteos se pueden encontrar daños no lipolíticos de apariencia similar, excepto por la ausencia de la zona opaca y la zona externa clara. Los aislados dañados obtenidos de alimentos congelados o disecados, que hayan sido guardados por largos periodos de tiempo frecuentemente desarrollan menos coloración negra que las colonias típicas y puede presentar apariencia rugosa y textura seca.

Prueba de Coagulasa

1. Seleccionar colonias típicas sospechosas y transferirlas a un tubo conteniendo 0.2 a 0.3 mL de Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) y agitar.
2. De esta suspensión, inocular un tubo conteniendo agar inclinado TSA con bisel
3. Incubar el TSA y el BHI a 35 °C por 18 a 24 horas

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 07
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i>	Página 9 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

4. Retener el cultivo en TSA a temperatura ambiente para pruebas adicionales o por si fuera necesario repetir la prueba de coagulasa
5. Añadir a 0.5 mL de plasma de conejo con EDTA al cultivo de BHI y mezclar.
6. Incubar a 35⁰ C y examinar cada 6 horas para observar la formación de coagulo.
7. Solo si se observa un coagulo firme y completo que permanece en su lugar cuando el tubo es inclinado o invertido, se considera positiva la prueba para ***Staphylococcus aureus***.

Realizar la tinción al Gram y observar la morfología microscópica. (ver anexo # 4)

Prueba de Catalasa

Usar el crecimiento obtenido en agar inclinado TSA, para la prueba de la catalasa, colocando una gota de peroxido de Hidrógeno en un porta objetos y con el asa bacteriológica, se toma una colonia del tubo de TSA y se coloca en la gota de peroxido. La producción de burbujas de gas corresponde a una prueba positiva.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 07
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i>	Página 10 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Prueba de utilización de glucosa anaeróbica

1. Inocular masivamente con asa de alambre, tubos con medio de fermentación de carbohidratos que contenga glucosa (0.5%).
2. Hacer ciertas inoculaciones que alcancen el fondo del tubo
3. Cubrir el agar con capa de parafina estéril de \pm 25 mm de grosor.
4. Incubar 5 días a 37 °C. Se produce ácido anaeróbicamente si el indicador cambia a amarillo en todo el tubo. Indicando presencia de **S. aureus**.
5. Realizar tubos control (positivo y negativo), simultáneamente.

Prueba de utilización anaeróbica del manitol

1. Realizar inoculación como en el numeral anterior, usando manitol como carbohidrato
2. En este medio **S aureus** generalmente es positivo, pero por algunos daños puede dar resultados negativos
3. Realizar simultáneamente tubos controles

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 07
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i>	Página 11 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

IV. CALCULOS

Para la cuantificación de ***S. aureus*** realizar el conteo en un cuenta colonias se multiplica por el factor de dilución y el dato se reporta como UFC/g de muestra.

V. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

La prueba de la coagulasa solo se considera positiva si se observa un coagulo firme y completo que permanece en su lugar cuando el tubo es inclinado o invertido. En la pruebas de utilización de glucosa anaeróbica se toma como positivas siempre que se lleve tubos controles, igualmente en la de utilización del manitol, se deja a opción del analista, siempre llevando tubos de referencia.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

1. Examinar la muestra inmediatamente después de recibida. En caso de posponer el análisis congelar la muestras a -20 °C, hasta el momento del análisis.
2. Los volúmenes de las pipetas utilizadas en la preparación de las diluciones no deben ser menos del 10 % del volumen total de la pipeta.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 07
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i>	Página 12 de 17 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

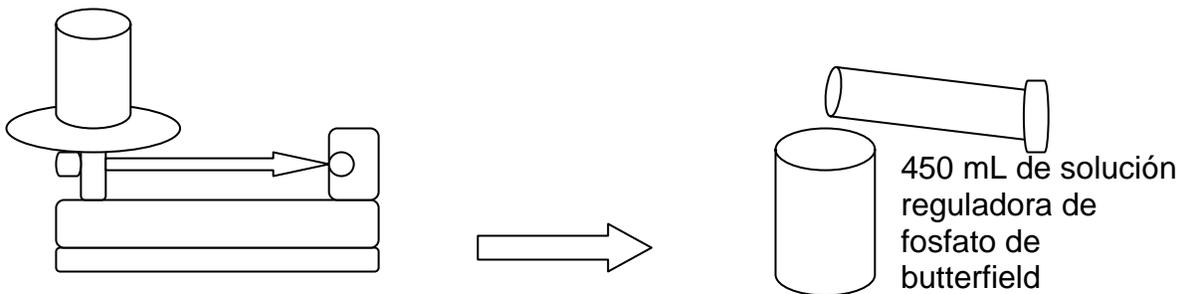
3. No se deben agitar los tubos al momento de comprobar la formación del coagulo en el medio de BHI con plasma de conejo, pues eso podría provocar que el coagulo formado se disuelva.
4. En caso de efectuar la prueba de la catalasa el porta objetos a utilizar tiene que flamearse por lo menos tres veces.
5. los utensilios y recipientes necesarios para el procedimiento deben encontrarse completamente estériles para evitar contaminación durante el desarrollo del análisis

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

Recuento e Identificación de ***Staphylococcus aureus***.

Método: extendido en placa

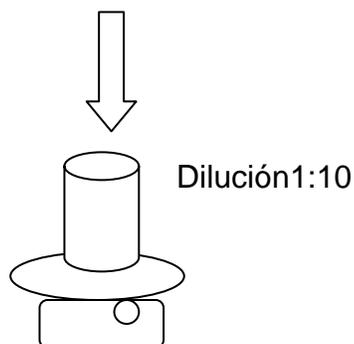
Preparación de la muestra



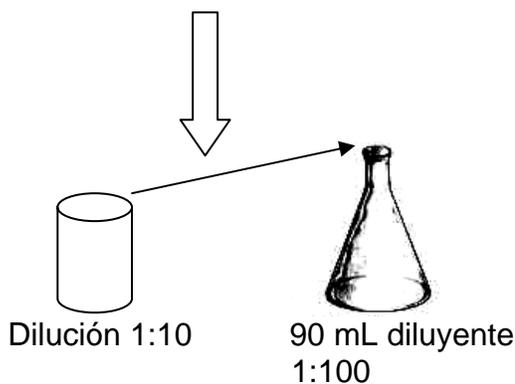
Pesar 50g de muestra

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 07
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i>	Página 13 de 17 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Hacer las diluciones inmediatamente después de homogenizada la muestra añadiendo 90 mL de del diluyente estéril más 10 mL de la dilución previa. Agitar las diluciones vigorosamente 25 veces en arco de 30 cm. por 7 seg.



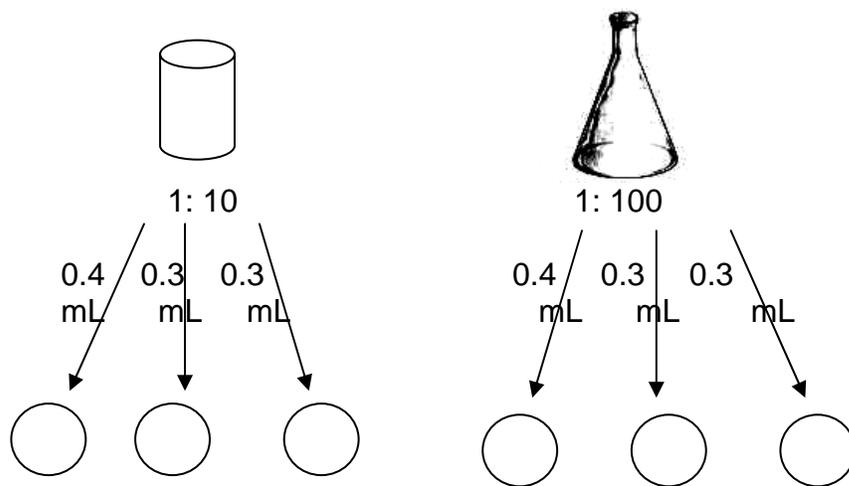
Licuar u homogenizar 2 min.



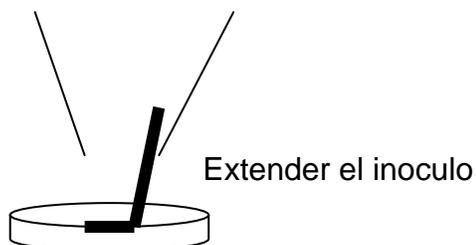
Preparar las diluciones que sean necesarias. No tardar más de 15 min. desde el momento de homogenizar la muestra, hasta que se encuentre en un medio adecuado.

Aislamiento y cuantificación de ***Staphylococcus aureus***

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 07
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i>	Página 14 de 17 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:



Medio Baird – Parker.



Dejar que el inculo sea absorbido por el agar durante 10 min. de lo contrario colocar las placas dentro de la incubadora con la tapadera hacia arriba, durante 1 hora

Invertir las cajas e incubar de 45 – 48 horas a 35⁰ C.

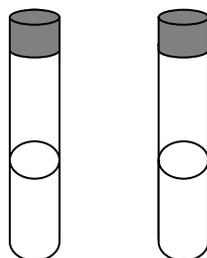
	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 07
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i>	Página 15 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:



Si en las cajas seleccionadas se observan varios tipos de colonias con apariencia de *S. aureus*, contar el número de colonias de cada tipo y anotarlas por separado.

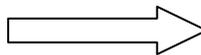
Prueba de coagulasa.

Seleccionar mas de una colonia de cada tipo contado y transferir esas colonias sospechosas a tubos.



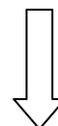
De esta suspensión

inocular 1 tubo
conteniendo TSA
con bisel

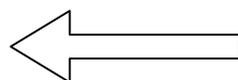


0.2 a 0.3 mL de caldo cerebro corazón (BHI)
y emulsificar

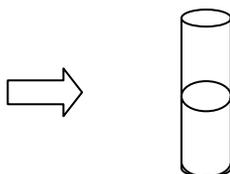
	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 07
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i>	Página 16 de 17 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:



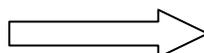
Retener el cultivo de TSA a temperatura ambiente para pruebas adicionales



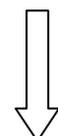
Incubar el TSA y el BHI a 35° C por 18 a 24 horas



Agregar 0.5 mL de plasma de conejo con EDTA al cultivo con BHI.



Incubar a 35° C, examinar cada 6 horas para ver el coagulo.



Prueba positiva:
Formación de coagulo firme y completo. Al Inclinar o invertir el tubo

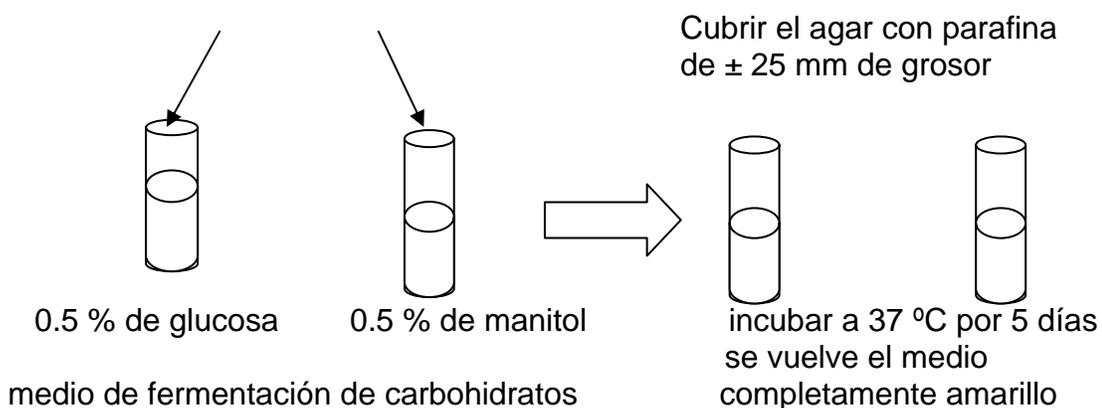
Prueba de Catalasa

Efectuar la prueba de la catalasa colocar una gota de peroxido de hidrogeno y añadirle con el asa un cultivo tomado del tubo de TSA. si produce burbujeo es prueba positiva.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 07
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i>	Página 17 de 17 Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Prueba de utilización de carbohidratos

Inocular masivamente con asa de alambre



Llevar a la par la inoculación de tubos controles positivos y negativos.

H. BIBLIOGRAFÍA Y DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA

Bacteriological Analytical Manual FDA, 8ª Edición, Revisión A, 1998.

Capitulo 12, edición actualizada 24 de octubre 2001.

I. ANEXOS

Resultados de Pruebas ⁽¹⁹⁾

PRUEBA O REACCION	<i>Staphylococcus aureus</i>
Catalasa	Positivo
Coagulasa	Positivo
Manitol 0.5%	Positivo
Glucosa 0.5%	Positivo

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO		Código: ALI -01 -P. 08
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL <i>Clostridium botulinum</i>		Página 1 de 12
			Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:	

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento de análisis del ***Clostridium botulinum*** que incluye el desplazamiento e identificación.

B. ALCANCES

El procedimiento puede utilizarse en cualquier clase de alimento que sea necesario analizar

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Anaerobiosis: Existencia en una atmósfera carente de oxígeno

Esporas: Cuerpo reproductivo asexual de los protozoos esporozoicos o de los hongos

Esporulación: Fisión múltiple ⁽²⁵⁾

D. POLITICAS

1. Los resultados de los análisis son confidenciales y específicos para el cliente que lo solicita.
2. Procedimientos de análisis deberán encontrarse al alcance de todo profesional encargado involucrado en el desarrollo del análisis.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 08
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL <i>Clostridium botulinum</i>	Página 2 de 12
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista aplicar el procedimiento según la naturaleza de la muestra.

F. REGISTROS DE CALIDAD

Para llevar a cabo el procedimiento de análisis se proponen los siguientes documentos:

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de la muestra	Secretaria y Profesional encargado
Protocolo del analista	Profesional encargado
Limpieza y sanitización del área de trabajo	Auxiliar de laboratorio
Monitoreo ambiental	Profesional encargado
Fichas técnicas (preparación de reactivos y medios de cultivos)	Auxiliar de laboratorio
Resultados de análisis	Profesional encargado

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 08
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL <i>Clostridium botulinum</i>	Página 3 de 12
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

G. DESAROLLO

I. INTRODUCCION

El ***Clostridium botulinum*** produce una proteína con característica neurotóxica.

El botulismo, un envenenamiento severo de la comida, resulta de ingerir comidas contaminadas con la toxina botulínica producida durante el crecimiento de ese organismo en la comida ⁽¹³⁾.

II. EQUIPO, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Equipo y Materiales

- a) Asas.
- b) Cuenta colonias Québec.
- c) Incubador 35⁰C.
- d) Pipetas estériles.
- e) Pipeteador
- f) Pinzas estériles.
- g) Placas de Petri estériles.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 08
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL <i>Clostridium botulinum</i>	Página 4 de 12
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

h) Mortero y pistilo estériles.

i) Tubos de ensayo.

Medios de Cultivo y Reactivos

a) Agar anaeróbico-yema de huevo.

b) Agar hígado de ternero-Yema de huevo.

c) Caldo enriquecido.

d) Caldo tripticasa – peptona – glucosa- extracto de levadura.

e) Etanol absoluto.

f) Medio de carne cocida.

g) Solución Buffer-gel-fosfato PH 6.2.

III. PROCEDIMIENTO

A. Examen preliminar.

1. Refrigerar las muestras hasta el análisis, excepto los enlatados sellados que no necesitan ser refrigerados, a menos que se encuentran hinchados y en peligro de estallar.
2. Antes del análisis, registrar la designación del producto, nombre del fabricante, origen de la muestra, tipo de contenedor y tamaño, etiqueta, lote, códigos y condición del contenedor.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 08
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL <i>Clostridium botulinum</i>	Página 5 de 12
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

3. Limpiar y marcar el contenedor con el código de identificación de laboratorio.

Para alimentos sólidos y líquidos.

1. Asépticamente, transferir la muestra, ya sea que contenga o no líquido, a un mortero estéril.
2. Añadir igual cantidad de solución de Buffer gel- fosfato y triturar con el pistilo estéril antes de la inoculación.
3. Alternativamente, inocular pequeñas piezas del producto, directamente al caldo enriquecido, con pinzas estériles.
4. Inocular el alimento líquido directamente en el caldo de enriquecimiento con pipeta estéril.
5. Después de cultivar, asépticamente, transferir la porción sobrante a un tarro estéril para pruebas futuras que puedan efectuarse y refrigerar.

B. Detección del *Clostridium botulinum*.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 08
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL <i>Clostridium botulinum</i>	Página 6 de 12
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Enriquecimiento

1. Remover el oxígeno disuelto del medio de enriquecimiento mediante calentamiento por 10-15 minutos y enfriar rápidamente sin agitación antes de la inoculación.
2. Inocular 2 tubos de medio carne cocida con 1-2 g de muestra sólida o 1-2 mL de muestra líquida, por cada 15 mL de caldo enriquecido. Incubar a 35^o C
3. Inocular 2 tubos de caldo de tripticasa - peptona-glucosa - extracto de levadura de la misma manera e incubar a 26^o C.
4. Introducir el inóculo lentamente por debajo de la superficie del caldo, hasta el fondo del tubo.
5. Después de 7 días de incubación, examinar los cultivos de enriquecimiento.
6. Chequear la turbidez, producción de gas, y digestión de las partículas de carne.
7. Notar el olor, examinar los cultivos microscópicamente, mediante la tinción al Gram, cristal violeta o azul de metileno y observar la morfología de los microorganismos y notar la presencia de células típicas de

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 08
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL <i>Clostridium botulinum</i>	Página 7 de 12
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

8. ***Clostridios*** y la esporulación y localización de las esporas dentro de las células. Una célula típica se asemeja a una raqueta de tenis.

Aislamientos de cultivos puros.

Pretratamiento de la muestra:

1. Añadir igual volumen de alcohol absoluto filtrado y esterilizado a 1 o 2 mL del cultivo de enriquecimiento en un tubo de rosca.
2. Mezclar bien e incubar 1 hora a temperatura ambiente.
3. Alternativamente, calentar 1 o 2 mL del caldo de enriquecimiento o muestra para destruir células vegetativas (80°C por 10 a 15 minutos). No use tratamiento de calor para los tipos no proteolíticos del ***Clostridium botulinum***.
4. Con un hisopo, inocular 1 o 2 hisopados de la muestra tratada con alcohol y del cultivo tratado con calor, cada uno a un agar de hígado de carnero- yema de huevo o agar de yema de huevo anaeróbico.
5. Para obtener colonias aisladas pueden efectuarse diluciones. Incubar a 35°C por 48 horas en condiciones anaeróbicas.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 08
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL <i>Clostridium botulinum</i>	Página 8 de 12
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

6. Selección de colonias típicas
7. Seleccionar 10 colonias típicas bien separadas las cuales pueden ser elevadas o planas, lisas o rugosas. Las colonias comúnmente muestran extensión y tienen borde irregular.
8. Inoculación: con un asa estéril inocular cada colonia elegida en un tubo de caldo estéril, incubar a 35⁰C por 7 días.

Aislamiento de cultivo puro:

1. Transferir los cultivos tóxicos por duplicado al medio de yema de huevo.
2. Incubar la 1a Placa en anaerobiosis a 35⁰C. Incubar la 2a placa aeróbicamente a 35⁰C.
3. Si las colonias típicas de ***Clostridium botulinum*** se encuentran solo en la placa anaeróbica (y no en la placa aeróbica) el cultivo puede que sea puro.
4. Repetir varias veces la transferencia a través de mas cultivos de enriquecimiento, puede incrementar el numero suficiente de colonias puras para permitir el aislamiento.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 08
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL <i>Clostridium botulinum</i>	Página 9 de 12
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

IV. CALCULOS

No aplica.

V. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Para el aislamiento se considera positiva la presencia de ***Clostridium botulinum***

cuando haya crecimiento en la placa de agar yema de huevo incubada en anaerobiosis y no en la placa a temperatura ambiente.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1- Las colonias se resiembran las veces que se considere necesario hasta obtener un cultivo puro
- 2- Se debe verificar el medio de cultivo, mediante el uso de cepas ATCC de ***Clostridium botulinum***.

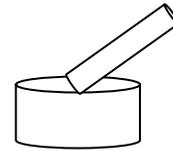
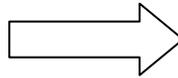
VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

Aislamiento e Identificación de ***Clostridium botulinum***

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 08
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL <i>Clostridium botulinum</i>	Página 10 de 12
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Preparación de la muestra

Examen preliminar (Registro de datos y refrigeración)

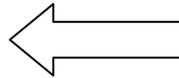
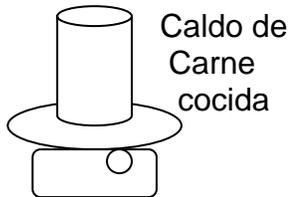


Transferir la muestra a un mortero estéril con solución buffer gel fosfato, triturar.

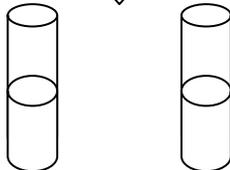
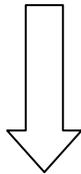


Inocular porciones en el caldo enriquecido (si es sólido) y si es líquido agregarlo con pipeta estéril

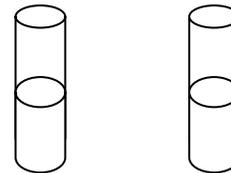
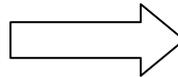
Enriquecimiento



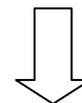
Remover el O₂ disuelto por calentamiento de 10 -15 min. enfriar sin agitación.



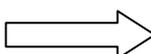
Inocular con 1 -2 g o 1 -2 mL de muestra en caldo carne cocida, incubar a 35 °C



Inocular la misma cantidad de muestra en caldo tripticasa - peptona -glucosa -extracto de levadura, incubar a 26 °C



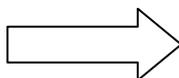
	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 08
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL <i>Clostridium botulinum</i>	Página 11 de 12
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

 Después de 7 días de Incubación, examinar.
 Observar al microscopio
 Por la tinción al Gram

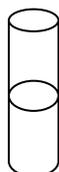
Aislamiento de cultivos puros



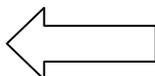
Añadir igual volumen a 1 o 2 mL de caldo de enriquecimiento.
 Mezclar bien e incubar 1 hora a Temperatura ambiente.



Calentar 1 o 2 mL del caldo de enriquecimiento, a 80 °C por 10 a 15 minutos.

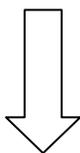


Seleccionar 10 colonias típicas de cada placa e inocular cada placa e inocular cada colonia elegida en un tubo con caldo estéril. Incubar a 35 °C por 7 días

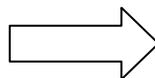


Con un hisopo, inocular de ambos tubos en 2 placas con agar de hígado de carnero – yema de huevo. Incubar a 35 °C por 48 horas en condiciones de anaerobiosis.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 08
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL <i>Clostridium botulinum</i>	Página 12 de 12
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:



Transferir los cultivos por duplicado
Al medio de yema de huevo. Incubar
1 placa de anaerobiosis a 35 °C y la
otra, aeróbicamente a 35 °C.



Si las colonias crecen
solo en la placa
anaeróbica, el cultivo
puede ser puro ^(13 y 28)

H. BIBLIOGRAFÍA Y/ O DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA

AOAC Oficial Methods of analysis of AOAC International Bacteriological Analytical Manual on line, FDA 1992. 4a edición 1984, Pág. 955, 956.⁽³¹⁾

Diccionario de ciencias Médicas. Steddmon. 25⁰ edición. Editorial medica panamericana.⁽²⁸⁾

Bacteriological Analytical Manual FDA, 8^a Edición, Revisión A, 1998.

Capitulo 17, edición actualizada 24 de octubre 2001.

I. ANEXOS

No aplica

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 09
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> y Bacterias coliformes	Página 1 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento empleado para el Aislamiento e Identificación de ***Escherichia coli*** y de bacterias coliformes en alimentos utilizando el método del número mas probable.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable a toda muestra de alimentos para los cuales se solicite la determinación de ***Escherichia coli*** y bacterias coliformes.

C. DEFINICIONES

Número Más Probable (NMP): Es el número que da un valor estimado de la densidad media de las bacterias coliformes,

Escherichia coli: Bacilos gramnegativos, termotolerantes, no formadores de esporas que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas.

Bacterias coliformes: Bacterias que se encuentran en el intestino humano o en el de otras especies, la más conocida es la ***E. coli*** ⁽¹¹⁾.

D. POLITICAS

1. Los resultados de los análisis son confidenciales y específicos para el cliente que lo solicita.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 09
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> y Bacterias coliformes	Página 2 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

2. Procedimientos de análisis deberán encontrarse al alcance de todo profesional encargado involucrado en el desarrollo del análisis.
3. Los materiales y reactivos utilizados son de la mejor calidad y los apropiados para los análisis.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista aplicar el procedimiento según la naturaleza de la muestra.

F. REGISTROS DE CALIDAD

Para llevar a cabo el procedimiento de análisis se proponen los siguientes documentos:

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de la muestra	Secretaria y Profesional encargado
Protocolo del analista	Profesional encargado
Limpieza y sanitización del área de trabajo	Auxiliar de laboratorio
Monitoreo ambiental	Profesional encargado
Fichas técnicas (preparación de reactivos y medios de cultivos)	Auxiliar de laboratorio
Resultados de análisis	Profesional encargado

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 09
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> y Bacterias coliformes	Página 3 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

Escherichia coli es una bacteria que se encuentra ampliamente distribuida en el intestino humano y en animales de sangre caliente, por ello es un indicador fecal porque suele encontrarse abundantemente en las heces humanas y animales. Esta bacteria es predominantemente anaeróbica facultativa que es fácilmente detectable por su habilidad fermentadora de lactosa.

Coliformes es un grupo de bacterias entericas, Gramnegativas, anaeróbicas facultativas; fermentan la lactosa para producir ácido y gas en 48 horas y a 35 °C ^(19.)

II. EQUIPO, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Equipo y Materiales

- a) Asas bacteriológicas
- b) Balanza.
- c) Baño de agua a 45°C ± 0.2°C.
- d) Cuenta colonias
- e) Erlenmeyer o frascos de dilución
- f) Equipo de uso general para microbiología

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 09
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> y Bacterias coliformes	Página 4 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

- g) Homogenizador
- h) Incubador
- i) Lámpara de luz ultravioleta.
- j) Pipetas graduadas estériles de 10 y 1mL
- k) Tubos de ensayo todos con tubo invertido

Medios de Cultivo y Reactivos

- a) Agar bilis rojo violeta (VRBA)
- b) Agar Citrato de Simmons
- c) Agar EMB
- d) Agar para contaje en caja (PCA)
- e) Agua para diluciones
- f) Caldo EC
- g) Caldo lauril triptosa(LTB) o Caldo lauril sulfato (LST)
- h) Caldo de Koser
- i) Caldo Triptona
- j) Caldo Lactosa verde brillante con 2% de bilis (L-BGB o Brilla)
- k) Indicador rojo de metilo (MR)
- l) Medio MR-VP
- m) Reactivo de Kovacs

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 09
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> y Bacterias coliformes	Página 5 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

- n) Reactivos para la tinción de Gram
- o) Reactivo Voges Proskauer

III. PROCEDIMIENTO

NMP Prueba Presuntiva para coliformes, coliformes fecales y

Escherichia coli

1. Pesar 50 g de muestra de alimentos y colocarlos en un, homogenizador estéril a alta velocidad
2. Agregar 450 mL de agua de dilución buferada de fosfatos de Butterfield y homogenizar por 2 min. Los alimentos congelados pueden ser refrigerados por ≤ 18 horas a 2-5 °C. Si la cantidad de muestra es < 50 g, pesar una porción equivalente a la mitad de la muestra y añadir la cantidad adecuada de diluyente estéril para hacer la dilución 1:10, el volumen total en la licuadora deberá cubrir completamente las aspas
3. Preparar diluciones decimales con diluyente estéril de fosfato de Butterfield. El número de diluciones a preparar depende de la densidad de coliformes esperados. Agitar las suspensiones 25 veces en un arco de 30 cm. durante 7 segundos. No verter volumen $< 10\%$ del volumen total de la pipeta.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 09
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> y Bacterias coliformes	Página 6 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

4. Transferir porciones de 1 mL a 3 tubos de LST por cada dilución consecutiva. Sostener la pipeta en un ángulo tal que descargue en la pared del tubo.
5. Dejar drenar la pipeta durante 2 a 3 segundos.
6. No deben transcurrir mas de 15 minutos desde el momento en que la muestra se homogenizó hasta que todas las diluciones estén inoculadas en los medios adecuados.

Nota: Utilizar el procedimiento de NMP con 5 tubos para agua marina y productos marinos.

7. Incubar los tubos 48 ± 2 h a 35°C . Examinar los tubos a las 24 ± 2 h para ver formación de gas, o efervescencia cuando los tubos se agitan.
8. Reincubar los tubos negativos durante 24 h adicionales. examinar para observar producción de gas. Realizar las pruebas confirmativas sobre todos los tubos presuntamente (gas) positivos

NMP Prueba confirmativa para coliformes

De cada tubo de lauril tripitosa con producción de gas, transferir una asada de suspensión a un tubo de caldo lactosa bilis verde brillante (BGLB), evitando la inoculación de película de la suspensión si hubiese

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 09
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> y Bacterias coliformes	Página 7 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

presente. Incubar los tubos a 35°C y examinar la producción de gas a 48±2 horas. Calcular el número más probable.

NMP Prueba confirmativa para Coliformes fecales y *E. coli*.

1. Seleccionar todos los tubos positivos de la inoculación en caldo lauril triptosa.
2. Agitar cada tubo positivo e inocular con un asa tubos con caldo EC.
3. Incubar los tubos con caldo EC en un baño de agua a 45.5 °C ± 0.2°C durante 24 horas ± 2 horas y examinar la producción de gas. Si es negativa, reincubar y examinar de nuevo a las 48 ± 2 h. Utilizar los resultados de esta prueba para calcular el NMP para coliformes fecales

Nota: El análisis para coliformes fecales son hechos a 45.5 °C ± 0.2°C, para todos los alimentos excepto para análisis de agua y productos marinos en este caso se utiliza una temperatura de 44.5 ± 0.2 °C

NMP-Prueba confirmativa para *Escherichia coli*:

1. De cada tubo positivo en EC, estriar para aislamiento una asada en agar L-EMB, e incubar a 35°C durante 18 – 24 horas.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 09
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> y Bacterias coliformes	Página 8 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

2. Examinar las cajas. Las colonias de *Escherichia coli* usualmente son planas con centro oscuro, con o sin brillo metálico.
3. Transferir 5 colonias típicas seleccionadas de cada placa L-EMB a agar inclinado PCA con bisel, incubar por 18 a 24 horas a 35 °C y
4. Utilizar este crecimiento para pruebas posteriores.

Nota: La identificación de 1 de las 5 colonias como *E. coli* es suficiente para considerar el tubo EC como positivo, sin embargo no necesitan ser probados los 5 aislados.

Coloración de Gram:

Preparar un frotis a partir del cultivo en PCA y colorear con Gram según el procedimiento en anexo # 1. *Escherichia coli* es un bacilo corto o cocobacilo Gramnegativo. Esta prueba debe ser confirmada por las pruebas de IMViC.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS:

Producción de Indol:

Inocular un tubo con caldo triptona e incubar 24 horas \pm 2 horas a 35°C. Agregar 0.2 a 0.3 mL de reactivo de Kovacs. La formación de un anillo rojo brillante en la capa superior del cultivo constituye una prueba positiva.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 09
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> y Bacterias coliformes	Página 9 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Compuestos reactivos Voges – Proskauer:

Inocular un tubo de caldo MR- Vp e incubar 48 ± 2 horas a 35°C . Transferir 1 mL a un tubo 13x100 mm. Agregar 0.6 mL de alfa naftol y 0.2mL de KOH al 40%, y agitar. Añadir unos pocos cristales de creatina. Agitar y dejar en reposo durante 2 horas. El desarrollo de un color rosado eosina constituye una prueba positiva.

Compuestos reactivos al rojo de metilo :

Luego de la prueba de Voges proskuer incubar 1 tubo de MR- VP por 48 ± 2 horas a 35°C . Agregar 5 gotas de solución de rojo de metilo a cada tubo. Un color rojo constituye una reacción positiva, un color amarillo es reacción negativa.

Citrato:

Inocular ligeramente un tubo con caldo de Koser, evitar turbidez en el caldo e incubar 96 horas a 35°C . El desarrollo de una turbidez marcada es reacción positiva.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 09
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> y Bacterias coliformes	Página 10 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Formación de gas a partir de la lactosa:

Inocular un tubo de caldo lauril triptosa (LST) e incubar 48 ± 2 horas a 35°C .

El desplazamiento del medio del tubo invertido o la efervescencia al agitar el tubo constituye una reacción positiva.

Medio sólido para Coliformes:

Preparar y autoclavar el agar bilis rojo violeta (VRBA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Enfriar a 48°C antes de usar

De las diluciones preparadas como se explico al inicio del procedimiento.

Transferir dos alícuotas de 1 mL de cada dilución a las cajas de petri en 10 mL de medio VRBA llevando a temperatura de 48°C

Agitar las placas en forma circular y dejar reposar hasta solidificar

Invertir las placas solidificadas e incubar 18-24 horas a 35°C .

Cuando la muestra sea producto lácteo incubar a 32°C

Examinar las placas bajo lentes de aumento (lupa) y con iluminación. Contar las colonias rojo púrpura que son de 0.5mm o de diámetro un poco mayor y están rodeadas por una zona de precipitado ácido bilis. las placas deben mostrar un crecimiento de 25 a 250 colonias.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 09
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> y Bacterias coliformes	Página 11 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Para confirmar la presencia de coliformes en las placas, tomar al menos 10 colonias presuntivas como coliformes y transferir a un tubo de caldo de lactosa bilis verde brillante (BGLB).

Incubar los tubos a 35°C. Examinar a 24 y 48 horas para ver la producción de gas determinar el numero de coliformes por gramo multiplicando el numero de colonias sospechosas por el porcentaje confirmado en el caldo BGLB por factor de dilución.

Nota: Si hay presencia de gas en los tubos de BGLB y muestran película de suspensión. Realizarle la tinción de Gram, para asegurar que la producción de gas no es debido a bacilos Grampositivos que fermentan la lactosa.

IV.CALCULOS

Para determinar el número de coliformes por gramo de muestra con el agar VRBA se hace, multiplicando el numero de colonias sospechosas por el porcentaje confirmado en el caldo BGLB por factor de dilución.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 09
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> y Bacterias coliformes	Página 12 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Bacterias Coliformes fecales

Utilizar las tablas de NMP del BAM y AOAC para leer el valor del NMP para alimentos sólidos y líquidos e informar como NMP/g ó NMP/mL.

Escherichia coli

Utilizar las tablas de NMP del BAM y AOAC para leer el valor del NMP para alimentos sólidos y líquidos e informar como NMP/g ó NMP/mL.

V. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

En la prueba de Indol La formación de un anillo rojo brillante en la capa superior del cultivo es una prueba positiva, en la de Rojo de metilo una coloración roja es prueba positiva y anaranjado o amarillo es considerada negativa. Para la del citrato se considera positiva cuando hay turbidez después de la incubación.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

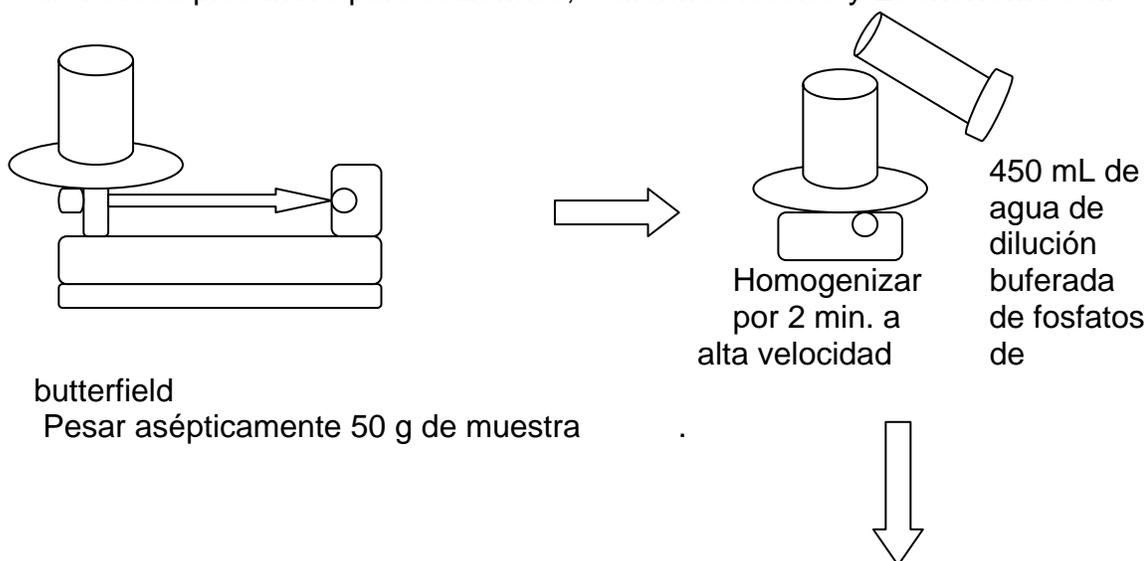
1. Eliminar el gas contenido dentro de los tubos invertidos, antes de inocular la muestra en el caldo lauril triptosa
2. Los utensilios utilizados en el procedimiento de análisis deben estar estériles para evitar cualquier tipo de contaminación de la muestra.
3. No verter menos del 10% del volumen total de las pipetas

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 09
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> y Bacterias coliformes	Página 13 de 17
Elaborado por:	Revisado por:	Vigente a partir de:
		Autorizado por:

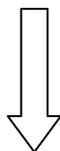
VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

Método convencional del Numero Más Probable

a. Prueba presuntiva para coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli*

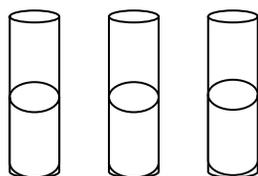


Los alimentos congelados pueden ser refrigerados por un tiempo ≤ 18 horas de 2 a 5°C; si la cantidad de muestra para análisis es <50 g pesar una cantidad equivalente a la mitad de la muestra, y se debe ajustar el volumen del diluyente para obtener la dilución 1:10, el volumen debe cubrir completamente las aspás.



Continua Pág. siguiente

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 09
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> y Bacterias coliformes	Página 14 de 17
Elaborado por:	Revisado por:	Vigente a partir de:
		Autorizado por:



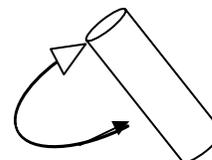
Tubos LST, 3 por cada



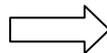
10 mL de
dilución
homogenizada



90 mL de s/n estéril
de fosfato butterfield



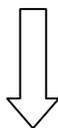
→ El número de diluciones
a preparar depende de la
densidad de coliformes
esperadas.



Sostener en un ángulo tal que
descargue en la pared del tubo.
Dejar drenar la pipeta durante
2 a 3 seg.

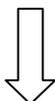


Mezclar las suspensiones 25
veces en un arco de 30 cm.
durante 7 seg. y transferir
porciones de 1 mL a tres tubos
LST por cada dilución
consecutiva.

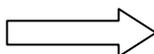
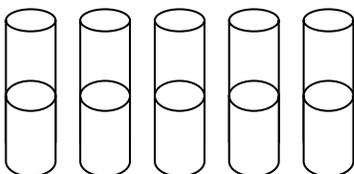


Incubar los tubos 48 ± 2 horas a 35°C . examinar los tubos a las $24 \text{ h} \pm 2$ horas para ver formación de gas o efervescencia cuando los tubos se agitan. Reincubar los tubos negativos durante 24 horas adicionales. Examinar para observar producción de gas.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 09
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> y Bacterias coliformes	Página 15 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:



COLIFORMES FECALES



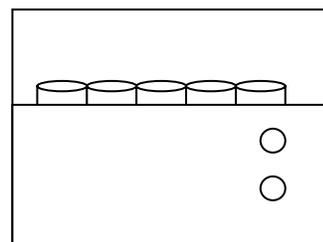
Agitarlos e inocularlos con un asa en tubos con caldo EC.



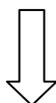
Tubos positivos en caldo Lauril triptosa.

Escherichia coli

Los tubos con evidente producción de gas después de 24 horas son considerados positivos y pueden ser sometidos a prueba confirmativa para *E. coli*. Los tubos negativos incubar Hasta completar 48 horas.



Incubar los tubos con caldo EC en un baño de agua a $45.5^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ durante 48 ± 2 horas



CONFIRMACIÓN DE *Escherichia coli*

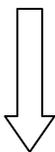
De cada tubo positivo en EC sembrar en agar L-EMB, Incubar a 35°C durante 18 a 24 ± 2 horas.

Continúa Pág. siguiente

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 09
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> y Bacterias coliformes	Página 16 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:



Examinar las
colonias de ***E. coli***
Usualmente son planas
Con centro oscuro con o
sin brillo metálico.
También pueden



Realizar coloración de Gram
según técnica general.
De la misma forma realizar
pruebas Bioquímicas según procedimiento.

H. BIBLIOGRAFÍA Y/O DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA

Bacteriological Analytical Manual FDA, 8ª Edición, Revisión A, 1998.

Capitulo 4, edición actualizada 30 de Diciembre 2003.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 09
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> y Bacterias coliformes	Página 17 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

I. ANEXOS

Tabla de resultados de reacciones típicas de *Escherichia coli* ⁽¹⁵⁾

Prueba o Reacción	<i>Escherichia coli</i>	
	Biotipo I	Biotipo II
Indol	+	-
Rojo de metilo	+	+
Voges Proskauer	-	-
Citrato	-	-
Tinción de Gram	Gram(-)	Gram(-)
Fermentación de lactosa con producción de gas	+	+

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 1 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento que se utiliza para el análisis de ***Salmonella sp*** en alimentos.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable a todas las muestras de alimentos para las que el cliente solicite el análisis de ***Salmonella sp***.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Salmonella sp: Las especies del genero ***Salmonella sp*** son bacilos gramnegativos, móviles, con flagelos peritricos son lactosa negativos, forman ácido y suelen producir H₂S⁽¹⁶⁾.

Goma Guar: El guar o la baba de racimo es muy probablemente natural de la india Esta se utiliza como espesante y emulsor en la formación de alimentos comerciales, se utiliza en preparaciones como salsas, productos lácteos.

D. POLITICAS

1. Verificar la calidad de los medios de cultivo antes de ser utilizados
2. Procedimientos de análisis deberán encontrarse al alcance de todo profesional encargado involucrado en el desarrollo del análisis.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 2 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista cumplir con el procedimiento descrito según la naturaleza de la muestra.

F. REGISTROS DE CALIDAD.

Para llevar a cabo el procedimiento de análisis se proponen los siguientes documentos.

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de la muestra	Secretaria y Profesional encargado
Protocolo del analista	Profesional encargado
Limpieza y sanitización del área de trabajo	Auxiliar de laboratorio
Monitoreo ambiental	Profesional encargado
Fichas técnicas (preparación de reactivos y medios de cultivos)	Auxiliar de laboratorio
Resultados de análisis	Profesional encargado

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 3 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCIÓN

El genero ***Salmonella sp*** es una de los principales agentes de intoxicación alimentaría por lo que se considera como la segunda causa mas común de enfermedades transmitidas por alimentos. Es responsable de millones de casos al año de enfermedades transmitidas por alimentos; origen: huevos crudos y mal cocidos, pollos y carnes mal cocidas, productos lácteos, mariscos, frutas y vegetales.

Su detección en laboratorios de alimentos implica como mínimo de 5-8 días en la detección, después de procesos de pre-enriquecimiento y enriquecimientos en las etapas preliminares antes de su identificación con pruebas bioquímicas y serologicas ⁽⁹⁾.

II. EQUIPOS MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Equipos y Materiales.

- a) Agitador de vidrio estéril
- b) Beaker estéril
- c) Beaker plásticos autoclavables
- d) Balanza con capacidad de 2000 g y sensibilidad de 0.1g
- e) Baño de agua

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 3 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

- f) Bolsas plásticas estériles
- g) Cajas petri estériles de vidrio o plásticas
- h) Erlenmeyer estéril
- i) Frascos de boca ancha con capacidad de 400mL, 500mL.
- j) Incubadora
- k) Mechero bunsen, asa bacteriológica
- l) pH-metro
- m) Pipetas estériles

Medios de Cultivo y Reactivos

Medios de cultivos: Preparar los medios de acuerdo a especificaciones del fabricante

- a.) Caldo dulcitol rojo fenol
- b.) Caldo lisina descarboxilasa
- c.) Caldo MR – VP
- d.) Caldo Nutritivo
- e.) Caldo selenito cistina (SC)
- f.) Caldo tetrionato (TT)
- g.) Caldo tríptico de soya

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 4 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

- h.) Caldo universal
- i.) Estéril de agar 1.5 %
- j.) Leche desgrasada
- k.) Medio de urea
- l.) Medio para movilidad, Indol y Ornitina (MIO)
- m.) Medio Rappaport - vassiliadis
- n.) Solución acuosa de papaina al 5%
- o.) Sulfato de sodio dodecilato

Reactivos.

- a) Indicador rojo de metilo (MR).
- b) Reactivo de Kovacs
- c) Reactivo de Voges – Proskauer
- d) Solución de NaOH 1N
- e) Solución de HCL 1N
- f) Solución salina fisiológica estéril al 0.85%
- g) Solución salina fisiológica formalinizada

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 5 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

III. PROCEDIMIENTO

A. PREPARACION DE ALIMENTOS PARA EL AISLAMIENTO DE *Salmonella sp.*

Los siguientes métodos se basan en el análisis de 25g. de la unidad analítica a una relación de 1:9 muestra/caldo.

Depende de lo extenso de la composición, añadir suficiente caldo para mantener esta relación 1:9 a menos que se indique de otra manera

Para muestras no analizadas sobre una base exacta de peso, ej. Ancas de rana, referirse al método específico para instrucciones.

1. Yema de huevo desecada, clara de huevo, huevo entero desecado, leche líquida (Leche entera, leche con 2% de grasa, leche descremada, nata de leche), mezclas preparadas en polvo (pastel, panqué, galleta, bollos, bizcocho, y pan), formulas infantiles, alimentos para alimentación oral o tubo conteniendo huevo. Si la muestra está congelada debe descongelarse por debajo de 45 °C. por 15 minutos con agitación constante en baño de agua o durante 18 horas a 25 °C.

Asépticamente pesar 25 g de muestra dentro de un recipiente estéril u otro recipiente apropiado. Si la muestra no esta en polvo, agregar 225 mL

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 6 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

de caldo lactosado estéril y homogenizar. Si el producto esta pulverizado, agregar 15 mL de caldo lactosado estéril y mezclar con un agitador de vidrio, cuchara o bajan lenguas estériles para suavizar la suspensión. Agregar 3 porciones de 10, 10, 190 mL. de caldo para completar 225 mL.

Mezclar hasta que la mezcla quede suspendida sin grumos. Asegurar la tapadera y dejar reposar 60 minutos a temperatura ambiente.

Mezclar bien por rotación, determinar el pH con papel de prueba y ajustarlo si es necesario a 6.8 ± 0.2 con NaOH 1N o HCl 1N estériles.

Asegurar la tapadera y mezclar bien antes de determinar el pH final y continuar como se describe en B.

2. Huevos

a) Cáscara de Huevo: Lavar los huevos con un cepillo y escurrirlos. Enjabonar con una solución conteniendo 0.1% de sulfato de sodio dodecilico (SDS) por 30 min. Preparar 200rpm. De solución de SDS en cloro al 0.1% añadiendo 8 mL de lejía comercial (5 - 25% de hipoclorito de sodio) a 992mL de agua destilada conteniendo 1g de SDS. Preparar antes del análisis. Quebrar los huevos asépticamente dentro de un contenedor estéril y lentamente mezclar las claras con las yemas con una cuchara estéril u otro instrumento.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 7 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Asépticamente pesar 25g en un erlenmeyer estéril a 500mL. Añadir 225mL de Caldo Tripticasa Soya suplementado con Sulfato Ferroso. (35mg de sulfato ferroso, se añaden a 1000 mL del caldo.) y mezclar bien.

Dejar en reposo 60 ± 5 min. A temperatura ambiente, mezclar bien y determinar pH con papel. Ajustar si es necesario a 6.8 ± 0.2 . Incubar a 24 ± 2 horas a 35°C . y continuar como en B.

b) Huevos enteros liquido (homogenizado) pesar 25g. en un erlenmeyer estéril de 500mL. Añadir 225mL de caldo tripticasa soya suplementado con sulfato ferroso y mezclar bien. Continuar como se describe en (a.)

c) Huevos cocidos (pollo, pato y otros) si la cáscara del huevo ha permanecido intacta, desinfectarla como se describe arriba y asépticamente separar la cáscara del huevo, pulverizar los huevos (yema y clara sólidas) asépticamente y pesar 25g. en un erlenmeyer de 500mL estéril. Añadir 25 mL. de caldo tripticasa soya con sulfato ferroso y mezclar bien. Continuar como se describe arriba.

Leche en polvo descremada

a) Instantánea. Asépticamente pesar 0.5g en un beaker estéril (250mL.). Usando un embudo estéril de vidrio o de papel, verter los 25g. lentamente sobre 225mL de agua verde brillante contenidos en un

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 8 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

erlenmeyer estéril de 500mL Preparar el agua verde brillante añadiendo 2mL de solución tinte verde brillante al 1% por 1000mL de agua destilada estéril. Dejar en reposo por 60 ±5 min. Incubar con la tapa aflojada del contenedor, por 24 horas ± 2 a 35 °C. Continuar como se describe en B

b) No instantánea: Proceder como se describe en (a).

Leche en polvo entera: Proceder como se describe en (a)

Caseína

a) Caseína Láctica. Asépticamente pesar 25 g de muestra en un beaker de

250mL estéril. Usando un embudo estéril de vidrio o papel, verter 25g

lentamente sobre una superficie de 225mL de caldo universal preenriquecido contenido en un erlenmeyer de 500mL. La unidad analítica (25g.) puede mezclarse. Dejar en reposo por 60 ± 5 min. Incubar con la tapa aflojada del contenedor sin mezclar o ajustar pH por 24 ± 2 horas a 35 °C. continuar como se describe en B.

b) Caseína Rennet: Asépticamente pesar 25g. y proceder como en (a) a excepción que se utilizan 225 mL de caldo lactosado contenidos en un erlenmeyer de 500mL.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 9 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

- c) Caseínato de sodio: Asépticamente pesar 25g. de muestra en una jarra estéril boca ancha con tapa enroscada de 500mL u otro contenedor apropiado. Añadir 225mL de caldo lactosado estéril y mezclar bien. La unidad analítica puede mezclarse. Dejar en reposo por 60min a temperatura ambiente con la jarra bien tapada. Mezclar bien y determinar pH con papel pH. Ajustar pH si es necesario a 6.8 ± 0.2 . Aflojar $\frac{1}{4}$ del giro de la tapa de la jarra e incubar 24 ± 2 horas a 35°C . continuar como se describe en B.
6. Harina de soya: Proceder como se describe para caseína láctica y caseína Rennet excepto que los 25g. de muestra no deben mezclarse.
7. Productos conteniendo huevos (tallarines, fideos, rollos de huevo, macarrones, espagueti), pastas, ensaladas preparadas (jamón, huevo, pollo, tuna pavo), frutas y vegetales desecados, frescos y congelados, harina de nuez, crustáceos (camarones, cangrejo, langostinos, langostas, cangrejo de río), y pescado. si la muestra esta congelada deberá llevarse a temperatura ambiente para obtener la porción analítica, descongelando 18 horas a $2 - 5^{\circ}\text{C}$. Asépticamente pesar 25 g, agregar 225 mL de caldo lactosado y homogenizar 2 minutos. Asépticamente transferir la muestra

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 10 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

a un recipiente estéril de boca ancha u otro recipiente apropiado, roscar la tapa y dejar reposar durante 60 min a temperatura ambiente con la tapadera bien asegurada. Mezclar bien por movimiento y determinar el pH con papel de prueba.

Si es necesario ajustar el pH a 6.8 ± 0.2 . Mezclar bien, aflojar la tapadera e incubar 24 ± 2 horas a 35°C . Continuar como se describe en B.

8. Levadura deshidratada (activa e inactiva): Asépticamente pesar 25 g de muestra dentro de recipiente de boca ancha y agregar 225 mL de caldo tripticasa soya estéril. Mezclar bien para obtener una suspensión sin grumos. Dejar reposar 60 minutos a temperatura ambiente bien tapado. Mezclar bien, determinar el pH con papel y si es necesario ajústelo a 6.8 ± 0.2 . Roscar la tapadera $\frac{1}{4}$ e incubar 24 ± 2 horas a 35°C para levadura inactiva continuar como en B.
9. Turrón y mezclas para cubrir: Pesar 25 g de muestra dentro de un recipiente boca ancha con tapadera agregar 225 mL caldo nutritivo y mezclar bien. Asegurar la tapadera y dejar reposar 60 ± 5 minutos a temperatura ambiente. Mezclar, medir el pH y ajustarlo si es necesario a 6.8 ± 0.2 Roscar la tapadera $\frac{1}{4}$ e incubar 24 ± 2 horas a 35°C . Continuar desde B.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 11 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

10. Especies:

a) Pimienta de castilla (pimienta negra), pimienta blanca, trozos o semillas de apio, chile, comino, pimentón, perejil, romero, ajonjolí, tomillo y vegetales en trozos u hojuelas. Pesar 25 g de muestra dentro de un recipiente de boca ancha, agregar 225 mL de caldo tripticasa soya y mezclar bien. Asegurar la tapadera y dejar reposar 60 minutos a temperatura ambiente, mezclar determinar el pH con papel y ajustar si es necesario a 6.8 ± 0.2 . Roscar la tapadera $\frac{1}{4}$ e incubar 24 ± 2 horas a 35°C . Continuar desde B.

b.) Cebolla en hojuelas, en polvo, ajo en hojuelas.

Asépticamente pesar 25g de muestra en un recipiente boca ancha de 500mL. preenriquecer la muestra en caldo tripticasa soya añadiendo k_2SO_3 . (5g. k_2SO_3 por 1000mL de tripticasa soya resultando al final una concentración de k_2SO_4 al 0.5%) Añadir k_2SO_3 al caldo antes de autoclavar, en volumen de 225 mL. en erlenmeyer de 500 mL. a 121°C . x 15 min.

Después de autoclavar asépticamente determinar y si es necesario, ajustar el volumen final a 225mL. Añadir los 225mL del caldo con k_2SO_3 a la muestra y mezclar bien. Continuar como sigue en literal (a).

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 12 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

c.) Pimiento, canela clavo y orégano.

Hasta este momento no se conocen métodos para neutralizar la toxicidad de estas cuatro especias. Deben diluirse hasta que sus niveles de las toxinas les permita analizarlas. El pimiento, la canela y el orégano se diluyen en una relación de 1:100 muestra/caldo y el caldo a 1:1000.

Examinar los condimentos gruesos a una relación mayor de 11:10 muestra/caldo, debido a la dificultad de absorberse en el caldo. Examinar como se describe en literal (a), manteniendo las relaciones muestra/caldo recomendadas.

11. Dulces y recubrimientos dulces (incluido el chocolate).

Asépticamente pesar 25g de muestra en un contenedor estéril, añadir 25mL de leche en polvo descremada reconstituida y mezclar 2 min. Asépticamente transferir la muestra homogenizada a un recipiente boca ancha de 500mL y dejar en reposo 60 ± 5 min. a temperatura ambiente con el recipiente bien tapado. Mezclar bien y determinar el pH con papel de prueba. Ajustar el pH si es necesario y mezclar bien. Roscar la tapadera $\frac{1}{4}$ e incubar 24 ± 2 horas a 35°C . continuar como se describe en (a).

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 13 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

12. Coco.

1. Asépticamente pesar 25g. de muestra en un recipiente de boca ancha de 500mL. Añadir 225mL de caldo lactosado estéril, mezclar bien, y determinar pH con papel de prueba. Ajustar el pH si es necesario a 6.8 ± 0.2 .
2. Añadir arriba de 2.25mL de triton tergitol aniónico calentado (15min.) y mezclar bien. Alternativamente usar triton X-100 calentado (15min.) Limitar el uso de estos surfactantes para minimizar la cantidad requerida para iniciar la espuma.

Para el triton X-100, esta cantidad debe ser por lo menos 2 a 3 gotas. Enroscar la tapa $\frac{1}{4}$ e incubar 24 ± 2 horas a 35°C . continuar como se describe en el literal (a).

13. Tinturas y colorantes para alimentos.

Para tinturas con pH 6.0 o mas (suspensión acuosa al 10%) usar el método descrito para huevo entero cocido. Para tinturas de laca o tinturas con pH debajo de 6.0, asépticamente pesar 25g. de muestra en un recipiente de boca ancha de 500mL. añadir 225mL de caldo tetracionato sin tintura verde brillante, mezclar bien y dejar en reposo 60

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 14 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

± 5 min a temperatura ambiente bien tapado, usando pHímetro, ajustar pH a 6.8 ± 0.2 . Añadir 225mL de solución de tinte verde brillante al 0.1% y mezclar completamente. Roscar la tapa $\frac{1}{4}$ e incubar 24 ± 2 horas a 35°C . continuar como se describe en (a).

14. Gelatina

Asépticamente pesar 25g de muestra en un recipiente boca ancha de 500mL. añadir 225mL de caldo lactosado estéril y 5mL de solución acuosa de papaina al 5% y mezclar bien. Tapar e incubar a 35°C . por 60 ± 5 min. Mezclar bien y determinar el pH con papel de prueba. Ajustar si es necesario a 6.8 ± 0.2 Roscar la tapa $\frac{1}{4}$ e incubar 24 ± 2 horas a 35°C . continuar como se describe en (a).

15. Carnes, sustitutos de carne, productos carnicos, sustancias animales productos glandulares y harinas (pescado, carnes, huesos).

Asépticamente pesar 25 g. de muestra en un contenedor estéril, añadir 225 mL de caldo lactosado y mezclar 2 min. Asépticamente transferir la mezcla homogenizada a un contenedor de boca ancha de 500mL y dejar en reposo 60 ± 5 min a temperatura ambiente bien tapado. Si la mezcla es polvo, el mezclado puede omitirse. Para muestras que no requieran el mezclado,

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 15 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

añadir caldo lactosado y mezclar completamente; dejar en reposo por 60 ± 5 min. a temperatura ambiente bien tapado.

Mezclar bien y determinar pH con papel. Ajustar pH si es necesario a 6.8 ± 0.2 añadir arriba de 2.25 mL de tergitol aniónico 7 calentado (15min.) y mezclar bien. Alternativamente, usar triton X-100 calentando (15 min.). Limitar el uso de estos surfactantes para minimizar la cantidad requerida para iniciar la espuma.

La cantidad actual depende de la composición del material de prueba.

Los surfactantes no se necesitan en análisis de productos glandulares pulverizados roscar la tapa $\frac{1}{4}$ e incubar las muestras 24 horas ± 2 a 35°C . continuar como se describe en (a).

16. Ancas de ranas (este método se usa para ancas de ranas domesticas e importadas)

Transferir 15 partes de ancas de ranas en una bolsa plástica y cubrir con caldo lactosado estéril a una relación muestra/caldo (g/mL) de 1:9

Si el promedio de la muestra es de 25g. o más, examinar solo una anca de cada una de los 10 pares. Transferir la bolsa a un beaker, mezclar bien y dejar en reposo 60 ± 5 min. a temperatura ambiente. Mezclar

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 16 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

bien y determinar pH con papel de prueba. Ajustar pH si es necesario a 6.8 ± 0.2 Transferir la bolsa plástica con la muestra a un beaker plástico. Incubar 24 ± 2 horas a 35°C . continuar como se describe en (a)

17. Conejo descarnado (este método es usado para conejos descarnados domésticos e importados).

Transferir el conejo en una bolsa plástica. Transferir la bolsa en un beaker. Añadir caldo lactosado estéril a una relación 1:9 para cubrir la muestra. Mezclar bien y dejar en reposo 60 ± 5 min. a temperatura ambiente mezclar bien y determinar el pH con papel. Ajustar si es necesario a 6.8 ± 0.2 Incubar 24 ± 2 horas a 35°C . continuar como se describe en (a)

18. "Goma Guar"

Asépticamente pesar 25g. de muestra en un beaker de 250 mL preparar solución de celulosa al 1% (añadir 1g. de celulosa a 99 mL de agua destilada estéril) dispensar en frascos de 150 mL (la solución de celulosa debe almacenarse a 2.5°C . por arriba de 2 semanas.) Añadir 225 mL. de caldo lactosado estéril, en un recipiente boca ancha de 500 mL mientras se agita vigorosamente la mezcla lactosa/celulosa

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 17 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

con agitador magnético, colocar 25 g. de muestra rápido por medio de un embudo de vidrio. Tapar el recipiente y dejar en reposo 60 ± 5 min. a temperatura ambiente. Incubar con la tapa aflojada sin ajustar pH por 24 ± 2 horas a 35°C . continuar como se describe en (a).

19. Jugo de naranja (pasteurizado y no pasteurizado), sidra de manzanas y jugo de manzana (pasteurizado y no pasteurizado).

Asépticamente añadir 25 mL de muestra a 225 mL de caldo universal preenriquecido en un recipiente boca ancha estéril de 500 mL. mezclar el contenido completamente. Tapar bien y dejar en reposo 60 ± 5 min. a temperatura ambiente. No ajustar pH. Incubar con la tapa aflojada por 24 ± 2 horas a 35°C . continuar como se describe en (a).

20. Orejas de puerco y otros tipos de bocadillos.

Transferir una pieza (2 ó 3 piezas si son muy pequeñas) a una bolsa plástica. Colocar la bolsa en un beaker grande. Añadir caldo lactosado a una relación de 1:9 para cubrir las piezas. Mezclar bien y determinar pH con papel. Ajustar pH si es necesario a 6.8 ± 0.2 Añadir cualquiera de tergitol aniónico 7 o triton X-100 calentados (15 min.) arriba de 1% de concentración. Por ejemplo, si se añaden 225mL de caldo lactosado

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 18 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

el volumen máximo para añadir surfactante es de 2.25mL. incubar 24 ± 2 horas a 35°C . continuar como se describe en (a).

A.) AISLAMIENTO DE ***Salmonella sp***

1. Tapar bien y mezclar la muestra incubada.

Goma Guar: Transferir 1 mL de la mezcla a 10 mL de caldo selenito cistina y 1 mL a 10 mL de caldo tetrionato.

Para los otros alimentos: Transferir 0.1mL de la mezcla a 10 mL de medio Rappaport-vasiliadis y 1 mL de mezcla a 10 mL de caldo tetrionato.

2. Incubar el medio selectivo de enriquecimiento como sigue:

- Alimentos con carga microbiana alta: incubar el medio Rappaport-vasiliadis 24 ± 2 horas a $42 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$. (en baño de agua con controlador termostático)
Incubar el caldo tetrionato 24 ± 2 horas a $43 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$.
- Alimentos con carga microbiana baja: (excepto goma guar): Incubar el medio Rappaport-vasiliadis 24 ± 2 horas a $42 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$. (en baño de agua con controlador termostático). Incubar el caldo tetrionato 24 ± 2 horas a $35 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 19 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

3. Mezclar y estriar con asa bacteriológica de 3mm. (10 mL) del caldo tetratonato, en agar bismuto sulfito (BS), agar xylosa lisina, desoxycolato (XLD) y agar entérico de Hektoen (HE)
4. Hacer lo mismo con el medio Rappaport-vasiliadis y con el caldo selenito cistina (goma guar)
5. Incubar las cajas 24 ± 2 horas a 35°C .
6. Examinar las cajas buscando colonias sospechosas de *Salmonella sp*

MORFOLOGIA DE LAS COLONIAS TIPICAS DE *Salmonella sp*

Picar 2 ó mas colonias de *Salmonella sp* de cada agar selectivo después de 24 ± 2 horas de incubación.

- a. Agar enterico de Hektoen (HE). Las colonias son azul verdosas o azul o sin centro negro. Muchos cultivos de *Salmonella sp* pueden producir colonias con centros negro lustroso o pueden aparecer como colonias completamente negras.
- b. Agar sulfito de bismuto (BSA). Las colonias pueden ser cafés grises o negras; algunas veces tiene brillo, metálico. El medio que rodea las

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 20 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

colonias usualmente es café al inicio, puede volverse negro al aumentar el tiempo de incubación produciendo el efecto de halo. Algunas cepas pueden producir colonias.

- c. Agar xilosa, lisina y desoxicolato (XDL). Colonias rosadas con o sin centro negro. Muchas colonias pueden tener centros negros grandes y lustrosos o pueden ser completamente negras.

MORFOLOGIA DE COLONIAS ATIPICAS DE ***Salmonella sp***

En ausencia de colonias típicas o atípicas de ***Salmonella sp***, investigar colonias atípicas como sigue.

- d. Agregar HE y XDL. Pocos cultivos de ***Salmonella sp*** producen colonias amarillas con o sin centros negros y si no hay colonias típicas, picar 2 o mas colonias atípicas.

- e. Agar BS. Algunas cepas pueden producir colonias verdes con poco o sin obscurecimiento del medio que las rodea. Si no hay colonias típicas o sospechosas a las 24 ± horas adicionales reincubar 24 ± 2 horas más.

Si después de las 48 horas no se observan colonias típicas o sospechosas, picar dos colonias atípicas.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 21 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

7. Tocar ligeramente el centro de la colonia con la aguja de inoculación e inocular TSI en bisel, extendiendo sobre el bisel y puncionando el fondo. Sin flamear, inocular LIA en bisel puncionando el fondo 2 veces y luego extender sobre el bisel. La descarboxilación de la lisina es estrictamente anaeróbica, por lo que el LIA tiene que tener un fondo de unos 4 cm. Almacenar las cajas de agar selectivo a 5 – 8⁰C.

8. Incubar los tubos de TSI y LIA a 35 °C por 24 ± 2 horas. Típicamente *Salmonella sp* produce bisel alcalino (rojo) y fondo ácido (amarillo) con o sin producción de H₂S (ennegrecimiento del medio) en TSI. En LIA, *Salmonella sp* produce reacción alcalina en el fondo (púrpura) del tubo. Considerar únicamente un color amarillo en el fondo del tubo como reacción ácida (negativa). No eliminar cultivos que producen decoloración en el fondo. La mayoría de cultivos de *Salmonella sp* producen H₂S en LIA. Algunos cultivos que no son *Salmonella sp* producen reacción rojo ladrillo el LIA en bisel.

9. Todos los cultivos que dan reacción alcalina del fondo en LIA, indiferentemente de la reacción en TSI deben ser retenidos como aislado potencial de *Salmonella sp* y ser sometidos a pruebas bioquímicas y serológicas.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 22 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Los cultivos que dan fondo ácido en LIA y un bisel alcalino y fondo ácido en TSI también se deben considerar aislados potenciales de *Salmonella sp* y ser sometidos a pruebas bioquímicas y serológicas. Los cultivos que dan fondo ácido en LIA y fondo y bisel ácido en TSI pueden ser descartados como negativos. Los cultivos retenidos como cultivos TSI presuntamente positivos se procesan como se describe en C. Si los cultivos en TSI fallan para dar reacciones típicas de *Salmonella sp*, picar colonias sospechosas de las cajas de medio selectivo e inocular tubos de TSI y LIA como se describe en B

–6

10. Aplicar pruebas bioquímicas a: tres cultivos presuntivos en TSI recuperados del set de cajas estriadas del SC y tres cultivos presuntivos en TSI recuperados de cajas estriadas del caldo TT y otros cultivos presuntivos recuperados del medio Rappaport-vasiliadis.

B. IDENTIFICACION DE *Salmonella sp*

1. Cultivo Mixto. Si el cultivo en TSI no esta puro, sembrar en agar MacConkey, agar HE o agar XDL. Incubar durante 24 ± 2 horas a 35° C. Examinar las cajas para presencia de colonias sospechosas de *Salmonella sp*.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 23 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

En MacConkey las colonias de *Salmonella sp* son claras (incoloras), algunas veces con el centro oscuro, examinar los otros medios como se describe anteriormente.

2. Cultivo Puro:

Prueba para ureasa: sembrar un tubo con medio urea por cada tubo TSI positivo. Incluir un tubo de urea no inoculado como control negativo Incubar 24 ± 2 horas a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. El desarrollo de un rosado maravilla es indicativo de prueba positiva.

3. Pruebas bioquímicas:

Ver Numeral IX: Anexos.

4. Prueba para cultivos ureasa negativos.

a. Caldo lysina descarboxilada.

Si la prueba en LIA fue satisfactoria, no se necesita repetir. Utilizar el caldo lysina descarboxilada si los cultivos dan reacción dudosa en LIA. Inocular caldo con una pequeña cantidad de colonias sospechosas del TSI. Tapar bien e incubar 48 ± 2 horas a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pero examinando a intervalos de 24 horas.

Salmonella sp causa reacción alcalina indicada con color rojo púrpura en el medio, prueba negativa se identifica con color amarillo Si no hay color

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 24 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

añadir unas gotas de tintura de púrpura bromocresol al 0.2% y observar la reacción.

b. Caldo dulcitol rojo fenol.

Inocular una pequeña cantidad con colonias de TSI. Tapar bien e incubar 48 ± 2 horas a 35°C . pero examinar después de 24 horas La mayoría de especies de *Salmonella sp* dan reacción positiva indicada por formación de gas en el interior del vial de fermentación y un pH ácido (amarillo) del medio.

La producción de ácido debe tomarse como reacción positiva.

CLASIFICACION DE CULTIVOS

Clasificar como *Salmonella sp* los cultivos que presenten una bioquímica igual a los descritos en la tabla de Reacciones Bioquímicas.

IV. CALCULOS

No aplica

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

Indica que *Salmonella sp* esta presente en la muestra, si las reacciones de análisis presentan los siguientes resultados:

- Rojo de Metilo: Positivo, coloración roja
- H_2S (TSI Y LIA): Positivo, ennegrecimiento
- Glucosa (TSI): Positivo, tubo con fondo color amarillo

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 25 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

- Lisina Descarboxilasa (LIA): Positivo, tubo con fondo color púrpura.

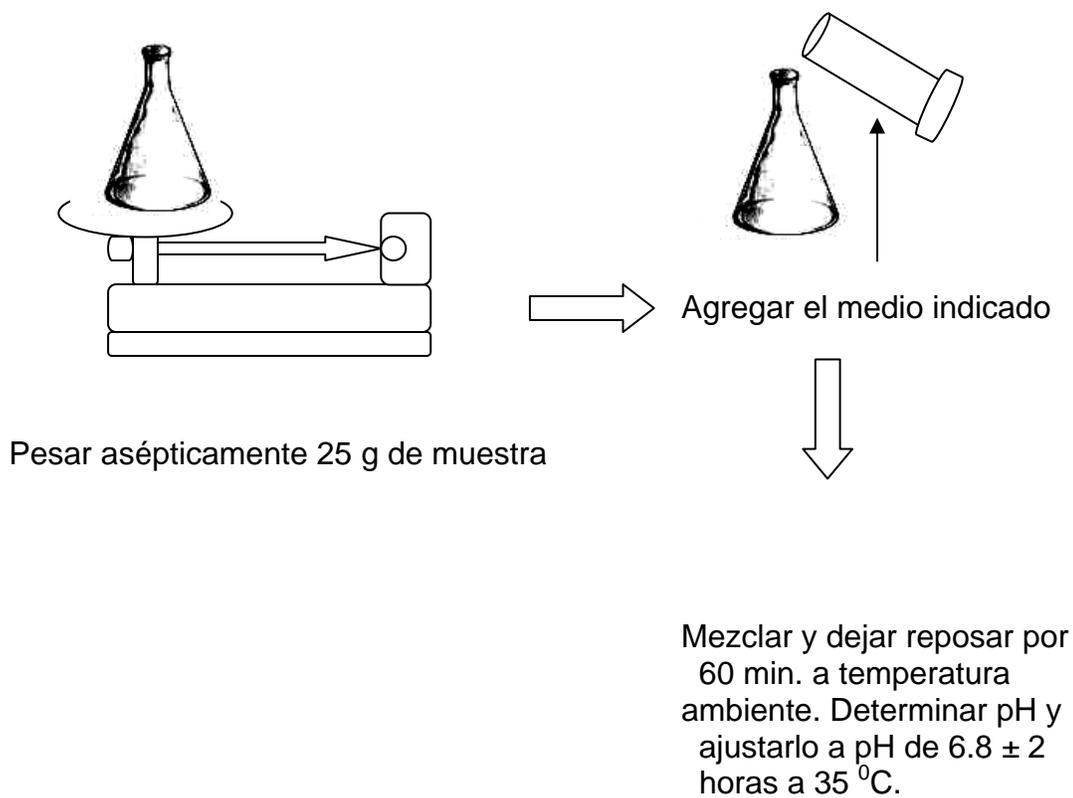
VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

1. Todos los utensilios y recipientes necesarios para la preparación de la muestra deben encontrarse completamente estériles para evitar contaminación o falsos positivos.
2. Verificar que la incubación en los medios TSI y LIA se efectúen en condiciones específicas de anaerobiosis.
3. Efectuar un control positivo para las pruebas utilizando una cepa de ***Salmonella sp***
4. Los medios de cultivos para las pruebas bioquímicas deben ser de preparación reciente.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 26 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

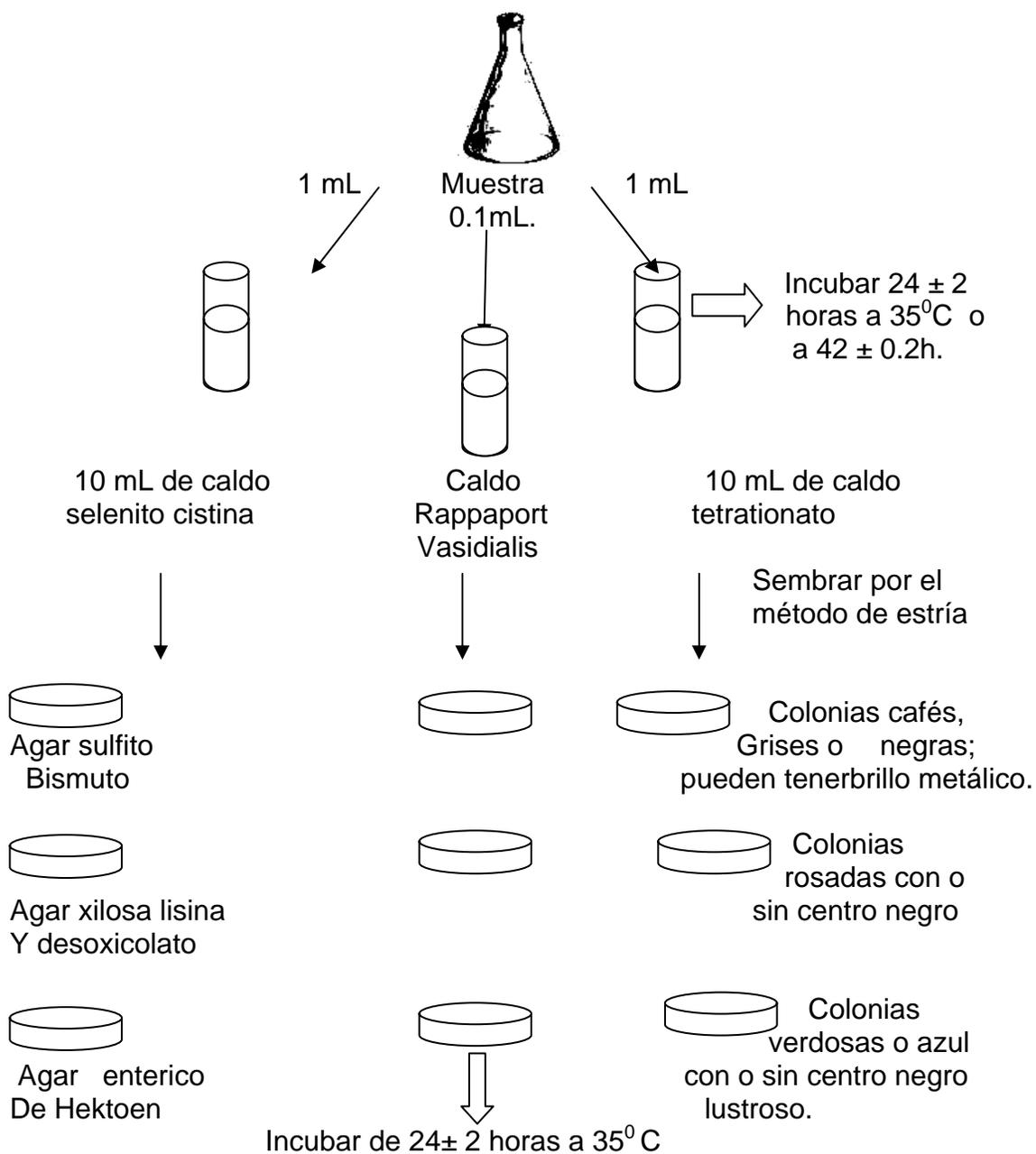
VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

a. Preparación de alimentos para el aislamiento de *Salmonella sp*



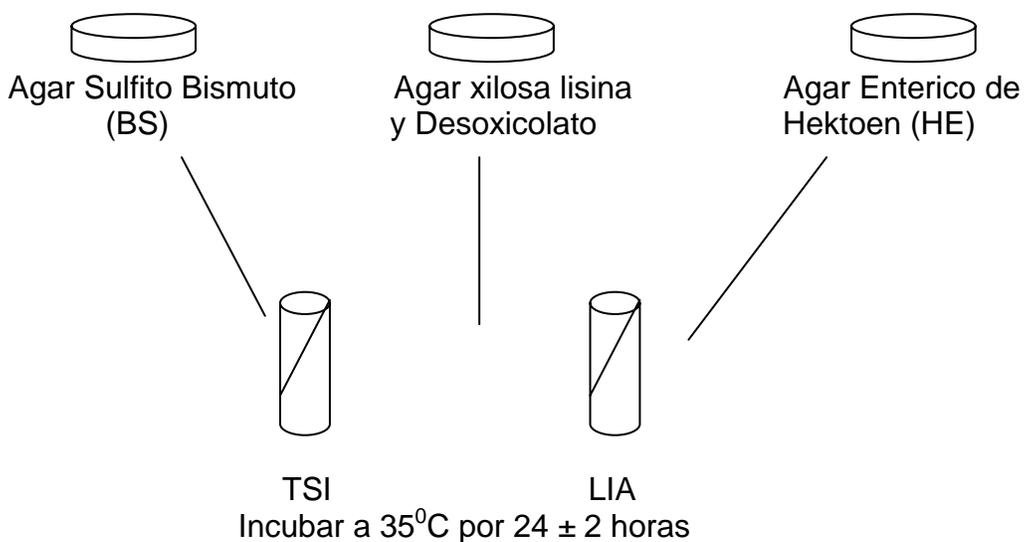
	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 27 de 31
Elaborado por:	Revisado por:	Vigente a partir de:
		Autorizado por:

b. Aislamiento de ***Salmonella sp***



	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE Salmonella sp	Página 28 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

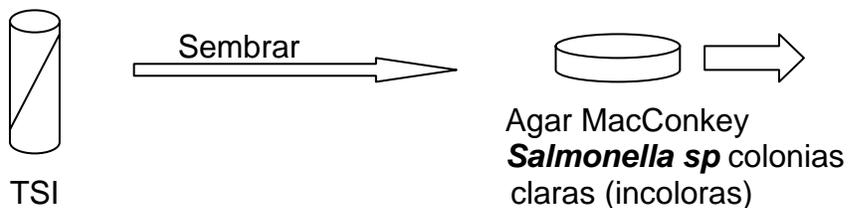
- Morfología de colonias atípicas de **Salmonella sp**



Todos los cultivos que den reacciones alcalinas del fondo en el LIA deben ser retenidos como: Aislado Potencial de **Salmonella sp**.

c. Identificación de **Salmonella sp**

1.) Cultivo Mixto:



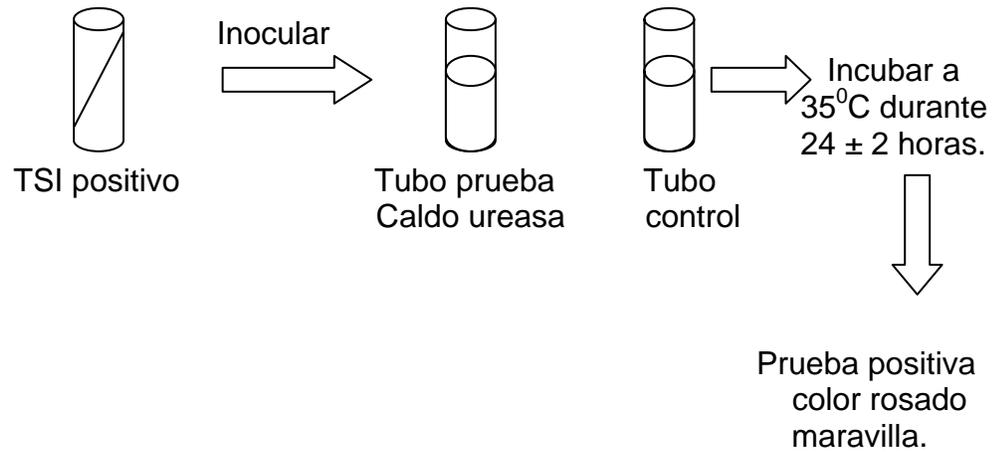
	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 29 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:



Incubar a 35⁰C durante 24 ± 2 horas.

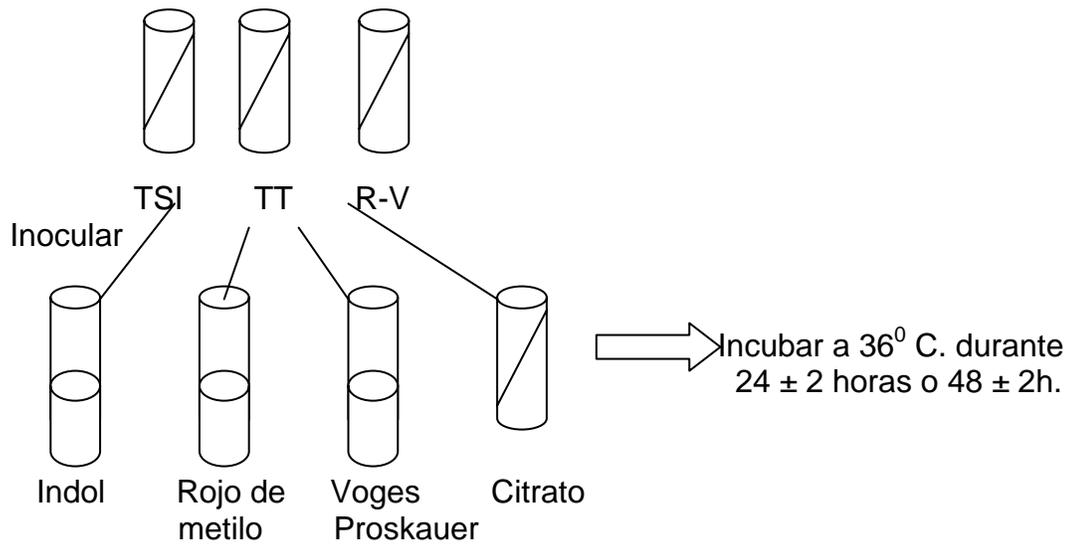
2.) Cultivo Puro

- Prueba para Ureasa

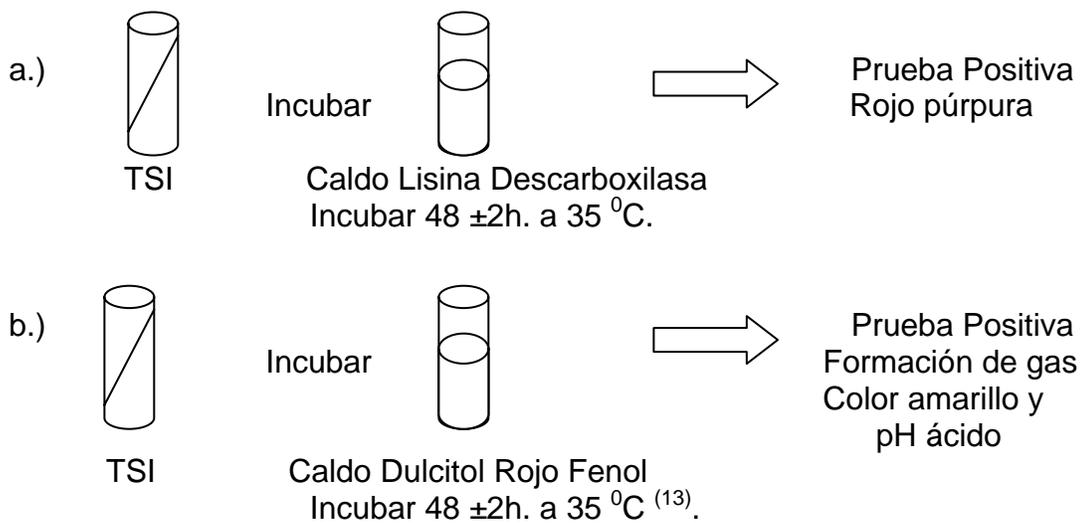


	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE Salmonella sp	Página 30 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

3.) Pruebas Bioquímicas



4.) Pruebas para Cultivos Ureasa Negativos



	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 10
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Salmonella sp</i>	Página 31 de 31
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

H. BIBLIOGRAFÍA Y/O DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA

Bacteriological Analytical Manual FDA; octubre 2001⁽¹⁵⁾, AOAC: Official Methods of Analysis of AOAC Internacional⁽³¹⁾

I. ANEXOS

REACCIONES BIOQUIMICAS DE *Salmonella sp*

PRUEBA O SUSTRATO	RESULTADOS		REACCION DE ESPECIES DE <i>Salmonella sp</i>
	POSITIVO	NEGATIVO	
Glucosa (TSI)	Fondo amarillo	Fondo rojo	+
Lisina descarboxilasa (LIA)	Fondo púrpura	Fondo amarillo	+
H ₂ S (TSI y LIA)	Ennegrecimiento	No ennegrecimiento	+
Ureasa	Rosa maravilla	No cambia color	-
Prueba del Indol	Violeta en superficie	Amarillo en superficie	-
Voges –Proskauer	Rosado –rojo	No cambia color	-
Rojo de metilo	Rojo difuso	Amarillo difuso	+
Citrato de Simmons	Crecimiento, azul	No crecimiento, no cambia color	V

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 11
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Bacterias heterótrofas</i>	Página 1 de 9
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

A. OBJETIVO

Conocer el método utilizado para el recuento total ***Bacterias heterótrofas*** en el laboratorio microbiológico de alimentos.

B. ALCANCES

El procedimiento puede utilizarse en cualquier clase de alimento que se necesite analizar.

C. DEFINICIONES

Bacterias Heterotróficas: Microorganismo que obtiene su carbono, así como su energía, de compuestos orgánicos.⁽²⁹⁾

D. POLÍTICAS

1. Los resultados de los análisis son confidenciales y específicos para el cliente que lo solicita.
2. Procedimientos de análisis deberán encontrarse al alcance de todo profesional encargado involucrado en el desarrollo del análisis.
3. Los materiales y reactivos utilizados son de la mejor calidad y los apropiados para los análisis.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista aplicar el procedimiento según la naturaleza de la muestra.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P. 11
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Bacterias heterótrofas</i>	Página 2 de 9
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

F. REGISTROS DE CALIDAD

Para llevar a cabo el registro de análisis se propone los siguientes documentos:

DOCUMENTOS	RESPONSABLE
Solicitud de análisis y entrega de la muestra	Secretaria y Profesional encargado
Protocolo del analista	Profesional encargado
Limpieza y sanitización del área de trabajo	Auxiliar de laboratorio
Monitoreo ambiental	Profesional encargado
Fichas técnicas (preparación de reactivos y medios de cultivos)	Auxiliar de laboratorio
Resultados de análisis	Profesional encargado

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCIÓN

El método utilizado para el análisis se llama placa vertida y es un procedimiento para estimar el número de ***Bacterias heterótrofas***. Las colonias pueden formarse de células individuales, de bacterias en pares, cadenas o agrupaciones, razón por la cual están incluidas en el término “Unidades Formadoras de Colonias (UFC)”.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 11
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Bacterias heterótrofas</i>	Página 3 de9
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Las colonias que se producen son relativamente pequeñas y compactas mostrando menos tendencia a interferir entre si que las producidas por Crecimiento superficial.

II. EQUIPO, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.

Equipo y Materiales

- a) Cajas de petri estériles
- b) Cuenta colonias Québec
- c) Frascos de dilución
- d) Freezer
- e) Incubador
- f) Pipetas graduadas estériles
- g) Pipeteador
- h) Refrigerador
- i) Termómetro

Medios de Cultivo

- a) Agar standard Methods (Plate Count)
- b) Agua peptonada

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 11
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Bacterias heterótrofas</i>	Página 4 de 9
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

III. PROCEDIMIENTO

1. Usando pipetas estériles, preparar diluciones decimales de 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} y otras apropiadas para alimentos homogenizados.
2. Transferir 10 mL de la dilución previa a 90 mL de Agua peptonada.
3. Agitar todas las diluciones 25 veces en arco de 30 cm. por 7 seg. , evitar formación de espuma.
4. Pipetear por separado 1 mL de cada dilución (hacerlo por duplicado), marcar apropiadamente las cajas petri.
5. Reagitar la dilución 25 veces en arco de 30 cm. por 7 seg. si permanece sedimentado por más de 3 min. antes de ser pipeteado en cajas de petri
6. Añadir 12-15 mL de agar plate count (fundido previamente a $45^{\circ}\text{C.} \pm 1^{\circ}\text{C.}$) dentro de 15 min de la dilución original en cada placas.
7. Inmediatamente mezclar las diluciones de las muestras y el medio del agar fuerte y uniformemente por rotación alterna y movimientos de los platos de atrás a adelante sobre una superficie plana. (técnica del ocho).
8. Permitir dejar que el agar solidifique.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 11
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Bacterias heterótrofas</i>	Página 5 de 9
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

9. Invertir cajas petri solidificarlas e incubarlas aproximadamente por 48 ± 2 horas a 35°C . No permitir un lapso mayor de 20 minutos entre la preparación de la dilución inicial y el vertido del medio en la última placa.

10. Dejar solidificar las placas, e incubarlas invertidas a 35°C por 48 horas.

IV. CALCULOS

Para calcular el número de colonias, se multiplica el promedio del número de colonias contadas por el factor de dilución.

Si alguna caja no presenta crecimiento, se informa de el resultado como menor de uno (<1), dividido entre el volumen de la muestra mayor utilizado.

Cuando hay más de 10 colonias por cm^2 , contar cuatro cuadros representativos, obtener el promedio por cm^2 y multiplicar por el factor de dilución.

Cuando el conteo de bacterias es mayor de 100 colonias por cm^2 informar como mayor de 6500 dividido entre el menor volumen de muestra utilizado para cajas de vidrio o mayor de 5700 dividido entre el menor volumen para cajas desechables

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 11
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Bacterias heterótrofas</i>	Página 6 de 9
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Si en las cajas se encuentran colonias que son expansivas, contar las colonias de un área representativa solo si están bien distribuidas en un área libre, y que las colonias expansivas no excedan la mitad del área total de la caja.

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

Para el recuento se aceptan las cajas que contengan de 30 - 300 colonias usando un cuenta colonias de Québec.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

1. Todos los utensilios y recipientes necesarios para pesar y preparar la muestra deben encontrarse completamente estériles para evitar contaminación.
2. La temperatura del agar Estándar método (Plata count) no debe ser mayor de 45 °C. al momento de verterlo.
3. Mezclar las placas varias veces con la técnica de ocho para asegurar la correcta distribución de la muestra en el medio.
4. El agar a utilizar debe ser fundido recientemente y se debe descartar el que no se usa dentro de 4 horas. El medio solo se puede fundir 2 veces.
5. La pipeta no se introduce mas de 2.5 cm. debajo de la superficie de la muestra o dilución para remover el volumen de siembra o dilución

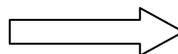
	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 11
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Bacterias heterótrofas</i>	Página 7 de 9
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

6. No se debe colocar en columnas las cajas cuando se les esta vertiendo el agar y cuando se esta solidificando.
7. Se debe usar esporas del *Bacillus estearothermophylus* ATCC para verificar el buen funcionamiento del autoclave.

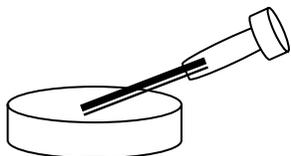
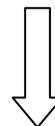
	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 11
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Bacterias heterótrofas</i>	Página 8 de 9
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

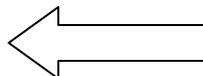
Preparar diluciones decimales
 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}
 Usando pipetas estériles



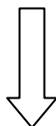
Transferir 10 mL de la
 dilución previa a 90 mL
 de agua peptonada



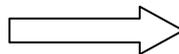
Pipetear por separado 1 mL
 De cada dilución
 (hacerlo por duplicado)
 Marcar apropiadamente las
 Cajas petri



Agitar todas las diluciones
 25 veces en arco de 30 cm.
 Por 7 seg, evitar formación
 de espuma.

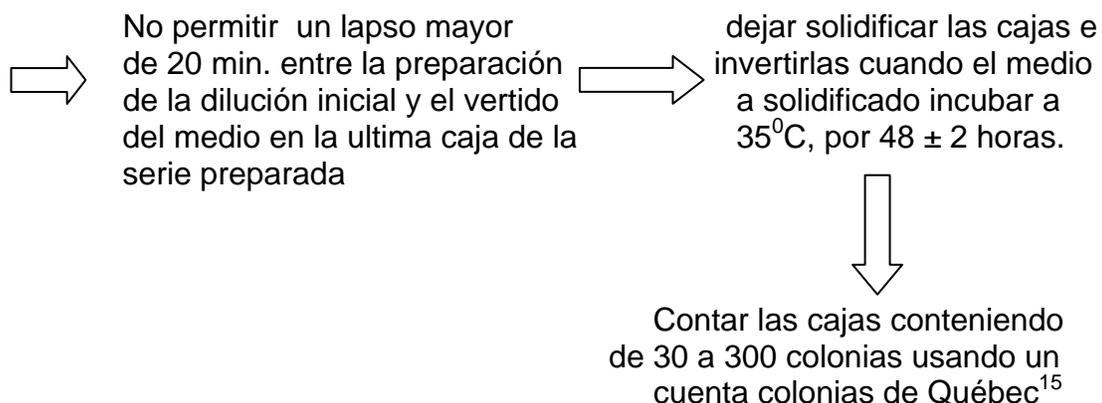


Añadir 12 a 15 mL de agar
 Plate count (fundido previamente
 a $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$)



Mezclar completamente
 rotando las cajas sobre una
 Superficie, en dirección de
 las agujas de reloj y luego en
 en sentido contrario formando
 la figura del numero ocho.

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI -01 -P. 11
	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>Bacterias heterótrofas</i>	Página 9 de 9
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:



H. BIBLIOGRAFIA

AOAC, Oficial Methods of Análisis of AOAC Internacional.⁽³¹⁾

Bacteriological analytical Manual online, FDA. Enero 2001⁽¹⁵⁾

I. ANEXOS

No aplica

CAPITULO VIII

INSTRUCCIONES DE MANEJO DE EQUIPO

8.1. ANTECEDENTES DEL CENTRO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO EN SALUD (CENSALUD).

Para que un Laboratorio Microbiológico de Alimentos funciones en forma adecuada y completa, debe poseer todo el equipo necesario que responda a las necesidades que los análisis demandan; el equipo a su vez, tiene que funcionar eficientemente y recibir una calibración y limpieza periódica.

En la Universidad de El Salvador existe el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) en cuyas Instalaciones se encuentra el Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico, Laboratorio destinado al análisis microbiológico de alimentos, antibióticos y aguas, contando con el equipo necesario para llevar a cabo los análisis en forma eficiente.

A continuación se presentan los antecedentes históricos, la misión y los objetivos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD).

En 1998, las autoridades de la Universidad de El Salvador suscribieron un convenio con el Gobierno Español destinado al desarrollo de facilidades de infraestructura y equipamiento para promover la investigación en el área de las ciencias de la salud.

En julio del año 2000, La Dra. María Isabel Rodríguez, rectora de la Universidad de El Salvador, discutió en España con funcionarios del grupo Anaya (DISTESA -Tecnología Educativa), representantes del Gobierno Español, la factibilidad y orientación del proyecto.

En noviembre de ese mismo año la Asamblea Legislativa de El Salvador aprobó a instancias de la Rectoría el préstamo de 7 millones de dólares otorgado por el Gobierno de España para la reconstrucción del edificio destruido por el terremoto de 1986, y su equipamiento para albergar el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud, (CENSALUD).

La inauguración de Centro el 24 de febrero de 2003, representa un esfuerzo importante de la Universidad de El Salvador, de crear con la cooperación del Gobierno de España, las facilidades de infraestructura física y equipamiento adecuado para iniciar el desarrollo científico en la institución.

El desarrollo de investigación científica y tecnológica, por tanto representa una oportunidad y un nuevo reto para la Universidad de El Salvador. En ésta época de la globalización lo más fundamental para competir en especial para los países en desarrollo, será la capacidad que posean para incorporarse efectivamente al desarrollo científico y tecnológico.

MISION

El Centro de Investigación y Desarrollo en Salud, (CENSALUD) ha sido concebido como un organismo Universitario adscrito a la Rectoría de la Universidad de El Salvador para asegurar su desarrollo técnico, administrativo y financiero. Su Misión es la de contribuir al desarrollo de la salud en El Salvador, mediante la Investigación Científica y Tecnológica, la enseñanza de Postgrado, la capacitación técnica avanzada y la oferta de consultoría y servicios de

Laboratorios especializados en beneficio de la Salud y el Desarrollo Social y Económico del País.

Para cumplir esta misión el Centro plantea una estrategia de trabajo interdisciplinaria e intersectorial en coordinación con el sector Salud y los sectores productivos y estatales que aseguren la transferencia tecnológica para la solución de problemas prioritarios de salud identificados.

OBJETIVOS

Los objetivos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) son:

1. Fomentar y conducir estudios sobre las condiciones de salud de la población Salvadoreña en el área biomédica, clínica y de salud pública, en estrecha coordinación con el sector salud y los sectores productivos y estatales que aseguren la innovación y la transferencia tecnológica para la solución de problemas prioritarios identificados y otros.
2. Promover la superación científica del personal docente del área de la salud para fortalecer las funciones de enseñanza, investigación y proyección social de la Universidad.
3. Apoyar el sistema de postgrado de la Universidad de El Salvador para formar una sólida comunidad científica, profesional y técnica.
4. Promover la articulación de los procesos de producción y utilización del conocimiento en el área básica (biotecnología) y aplicada, mediante

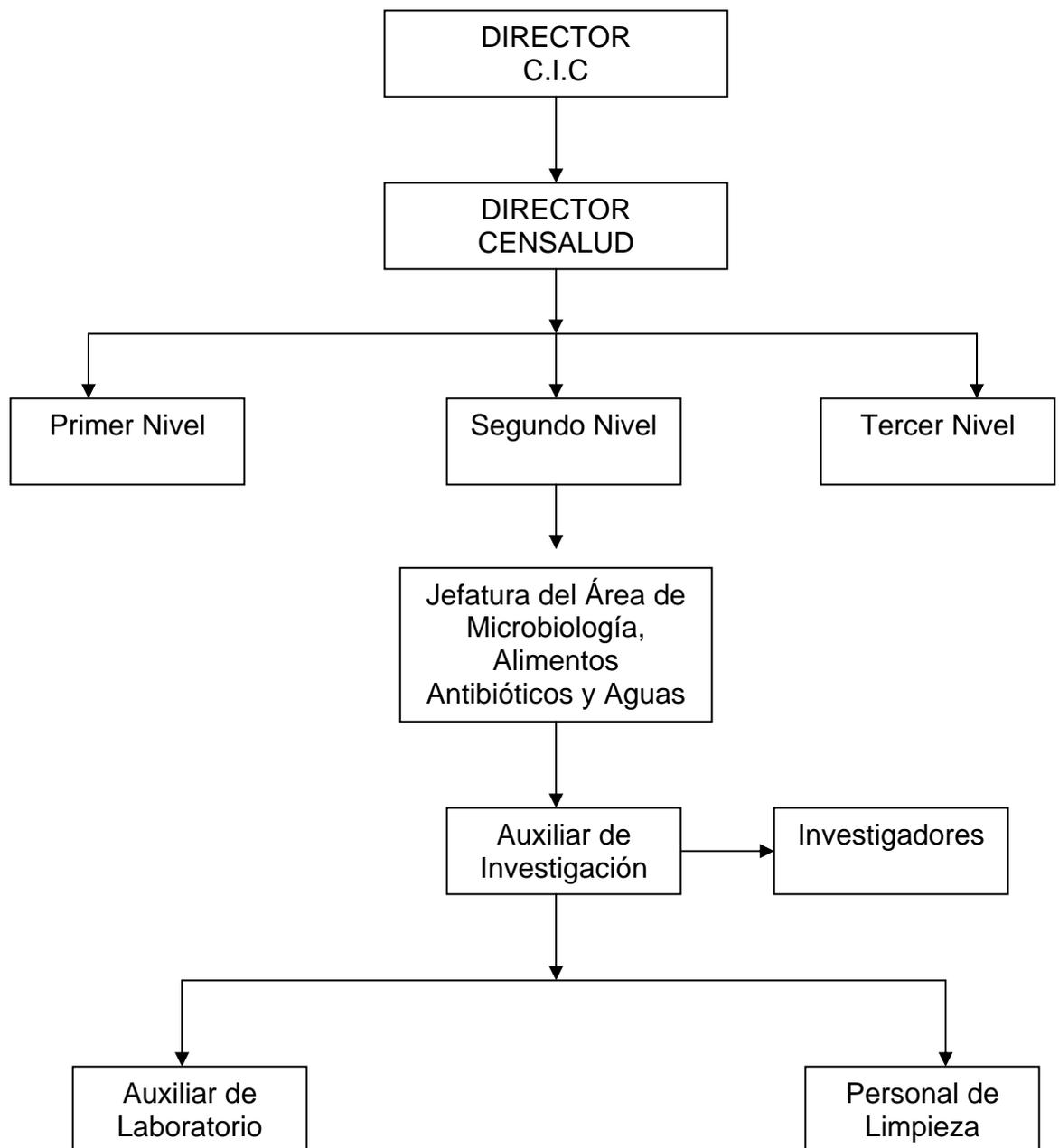
estudios multidiciplinarios de las Ciencias Médicas con las Ciencias Sociales, las Ciencias Naturales y Agrícolas y otras áreas con investigaciones convergentes al desarrollo de la salud.

5. Ofrecer servicios de laboratorio especializados que cumplan con normas de calidad internacional, en beneficio de la salud y el desarrollo social y económico del país.

POLITICA DE CALIDAD

El presente Laboratorio garantiza Calidad Técnica en las pruebas microbiológicas e investigaciones realizadas para que sean plenamente válidas y aceptables a nivel nacional e internacional; garantizando al usuario confiabilidad en los resultados.

ORGANIGRAMA LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD
MICROBIOLOGICO CENSALUD



Como se mencionó, CENSALUD cuenta con un Laboratorio capacitado para efectuar análisis microbiológico en el rubro de alimentos; para llevar a cabo dichos análisis cuenta con el equipo básico que se detalla a continuación:

1. Balanza electrónica Cobos
2. Baños termostáticos serie BA
3. Agitador eléctrico
4. Cámara de flujo laminar vertical
5. Baño Termostático
6. Incubador por CO₂
7. Armarios refrigeradores
8. Autoclave
9. Contador de colonias Comecta
10. Freezer
11. Agitador magnético eléctrico Agimatic-N
12. Microscopio Eclipse E400
13. Circulador Stomacher 400

Para poder darle el uso adecuado y al mismo tiempo asegurar la validéz de los resultados de los análisis, se han establecido las instrucciones de manejo de cada equipo detallado en el listado anterior.

8.2. INSTRUCCIONES DE MANEJO DE EQUIPO

A. OBJETIVO

Establecer las instrucciones de manejo del equipo empleado en el Centro de Investigación y Desarrollo para la Salud CENSALUD y en todo Laboratorio de análisis microbiológico de alimentos que cuenten con dichos instrumentos.

B. ALCANCE

Las Instrucciones de manejo son aplicables para todo el equipo del Laboratorio microbiológico de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud, (CENSALUD)

C. POLITICAS

1. El personal encargado en el manejo del equipo será personal capacitado.
2. Mantener el equipo en condiciones adecuadas para su óptimo funcionamiento.
3. Las instrucciones del equipo deberán encontrarse al alcance de todo personal involucrado en su manejo y uso.

D. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad de todo el personal autorizado para la utilización del equipo, hacer uso adecuado del mismo, siguiendo las instrucciones descritas para cada uno de ellos.

E. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

1. Verificar la limpieza de cada equipo antes de su uso
2. Realizar la calibración del equipo de acuerdo a fecha programada.
3. Utilizar el equipo bajo condiciones previamente establecidas por el fabricante.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE BALANZA ELECTRONICA COBOS	Código: ALI –01 –IE. 01
		Página 1 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

I. INTRODUCCION

Las Balanzas de la serie CB – Junior son robustas y con mecanismo de alta integración electrónica; no necesitan tiempo de espera para su estabilización.

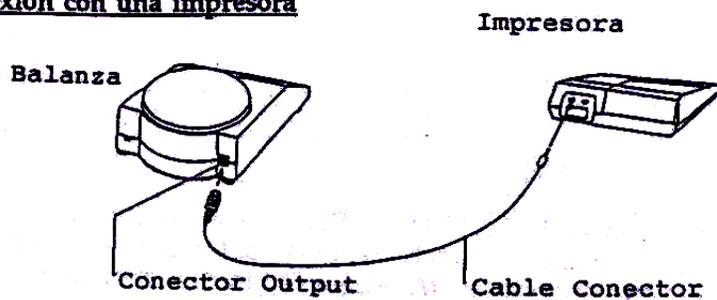
II. ESPECIFICACIONES Y PARTES DEL EQUIPO

ESPECIFICACIONES

- Capacidad de peso hasta de 600g.
- Precisión de 0.01g.
- Unidad de peso seleccionable entre gramo (g), onza (Oz), libra (Lb).

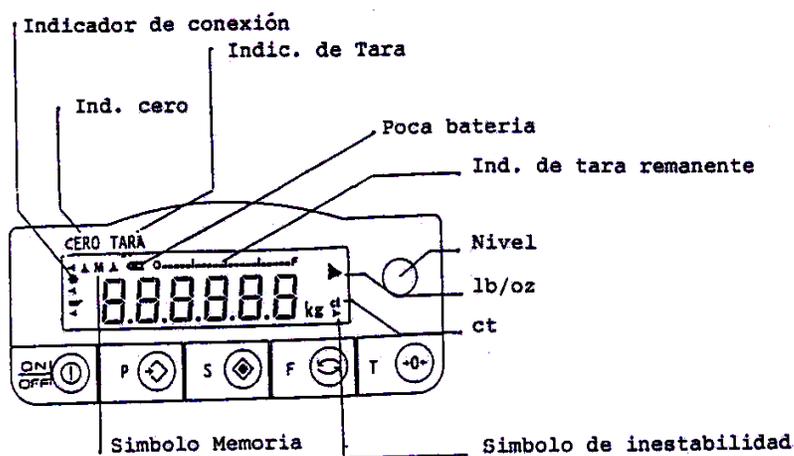
PARTES DEL EQUIPO

Conexión con una impresora



	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE BALANZA ELECTRONICA COBOS	Código: ALI -01 -IE. 01
		Página 2 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

VISTA DEL TECLADO



FUNCIONES DE EQUIPO

ON/OFF: Tecla de puesta en marcha / paro de la Balanza

P: Tecla de transmisión de datos

S: Tecla de finalización de selección de funciones

F: Tecla para entrar en el menú de funciones (también para seleccionar entre varias opciones dentro de una función)

T: Tecla para realizar la tara (también sirve para selección de parámetros)

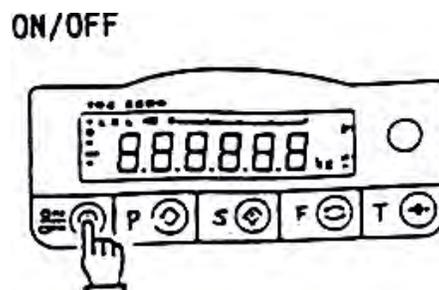
	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE BALANZA ELECTRONICA COBOS	Código: ALI -01 -IE. 01
		Página 3 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

III. PROCEDIMIENTO

A. PUESTA EN MARCHA

1. Conecte el cable del

adaptador de red en la parte posterior de la balanza y posteriormente conecte a la red el adaptador.



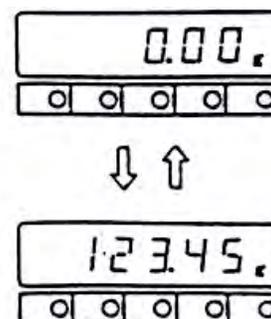
2. Pulse la tecla ON/OFF; se

encenderán todos los segmentos y caracteres del display efectuando un parpadeo de los mismos.



3. compruebe que la

balanza pesa, mediante una leve presión sobre el plato y que vuelve a su posición original al dejar de presionar.



	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE BALANZA ELECTRONICA COBOS	Código: ALI –01 –IE. 01
		Página 4 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

B. OPERACIÓN CON LA BALANZA

1. Pulse la tecla de puesta en marcha ON/OFF el display mostrará 0.00g.
2. Si pesa en un contenedor, sin que aparezca su peso en el display; colóquelo sobre el plato y pulse la tecla tara, para realizar un tarado del recipiente y el display se pondrá a cero.
3. Colocar objetos en el contenedor, para obtener el peso neto de dichos objetos.
4. Si el display no volviera a cero después de realizar una pesada, pulse la tecla tara.

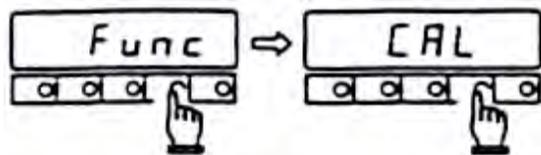
C. REALIZACION DE PESADAS CON VARIOS COMPONENTES

5. Sin sacar el contenedor, incluyendo el primer componente de su interior, pulse la tecla tara, el display se pondrá a cero.
6. Añada el siguiente componente en el contenedor, el display indicará el valor neto.

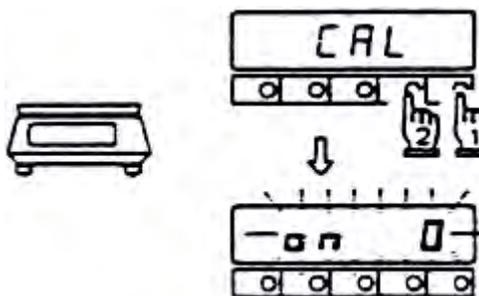
	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE BALANZA ELECTRONICA COBOS	Código: ALI -01 -IE. 01
		Página 5 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

D. CALIBRACION DEL EQUIPO

1. Pulse la tecla F hasta que aparezca "CAL" en el display.

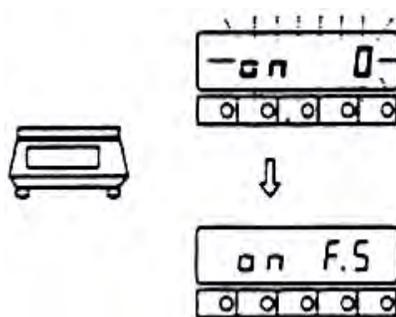


2. Verificar que el plato no tenga carga; pulse la tecla tara, manteniéndola pulsada, pulse la tecla F. El display indicara "On 0" (la balanza automáticamente se ajusta a cero.)



	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE BALANZA ELECTRONICA COBOS	Código: ALI -01 -IE. 01
		Página 6 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

3. Automáticamente la balanza pasará al ajuste de fondo de escala; indicando el display "ON F.S.". Colocar pesa de calibración en el centro del plato (dicha pesa puede ser cualquiera comprendida entre $\frac{1}{2}$ de la capacidad máxima y la totalidad de la capacidad), el display automáticamente indicará el peso exacto depositado sobre el plato.



- MENSAJE DE ERROR

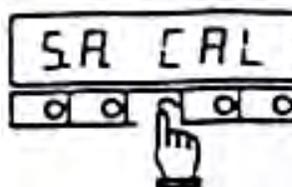
0-Err: Sobrecarga: La carga puesta sobre el plato excede la capacidad máxima de la balanza.

1-Err: La pesa de calibración es inferior a $\frac{1}{2}$ de la capacidad.

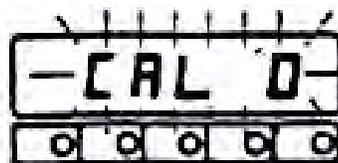
	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE BALANZA ELECTRONICA COBOS	Código: ALI -01 -IE. 01
		Página 7 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

E. CALIBRACION INTERNA

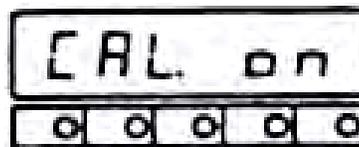
1. Pulse la tecla S para comenzar la calibración, el display indicara "S.A. CAL".



2. El display comenzará a parpadear indicando "CAL 0", ajustándose el "0" automáticamente.



3. El display pasara a indicar "CAL On", para proceder al ajuste de fondo de escala.

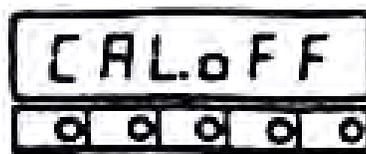


4. Gire suavemente el BOTON DE CALIBRACION en el sentido contrario de las agujas del reloj hasta la posición "CAL". El display parpadeará indicando que el ajuste de fondo de escala se está efectuando.



	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE BALANZA ELECTRONICA COBOS	Código: ALI -01 -IE. 01
		Página 8 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

5. En el display aparecerá “CAL o FF”, indicando que el ajuste de fondo de escala ha terminado.



6. Gire el botón de calibración a su Posición original (WEIGH). El display indicará “End”, habiendo finalizado el proceso de calibración.



IV. LIMPIEZA DEL EQUIPO

- Limpiar el plato de la balanza antes y después de realizar una pesada.

V. TERMINOS Y DEFINICIONES

- Peso: Fuerza de atracción gravitatoria que la tierra ejerce sobre un cuerpo.
- Precisión: Grado en que un instrumento de medida o un estadístico produce los mismos resultados al aplicarse sobre la misma magnitud (instrumento) o población (estadístico)
- Exactitud: Grado en que los resultados coinciden con un patrón de referencia claro y objetivo.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE BALANZA ELECTRONICA COBOS	Código: ALI –01 –IE. 01
		Página 9 de 10'
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

VI. BIBLIOGRAFIA Y/O DOCUMENTOS DE REFERENCIA

Manual del usuario serie CB – Junior, Cobos Precisión.1998, Barcelona,

pag.

1-15. ⁽³⁾

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE BAÑOS TERMOSTATICOS SERIE BA	Código: ALI –01 –IE. 02
		Página 1 de 4
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

I. INTRODUCCION

Los Baños termostáticos Serie BA poseen un sistema de regulación de temperatura mediante termostato hidráulico desde ambiente +5 °C hasta 120 ó 200 °C. Además están equipados con termostato de seguridad para casos de sobretemperatura.

II. ESPECIFICACIONES Y PARTES DEL EQUIPO

ESPECIFICACIONES

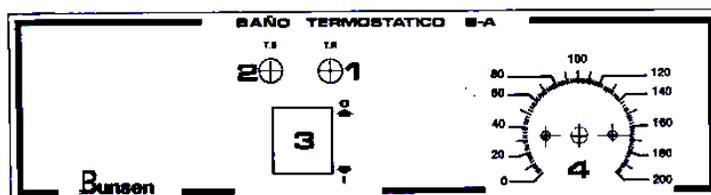
- a. Capacidad de volumen, 20 Litros.
- b. Temperatura máxima, 120 °C
- c. Precisión del equipo, ± 1 °C
- d. Termostato de seguridad regulable de 90 °C a 110 °C

PARTES DEL EQUIPO

- PANEL DE MANDOS

1. Piloto indicador de Calentamiento (ámbar).
2. Piloto indicador de funcionamiento del termostato de seguridad (rojo).
3. Interruptor luminoso de puesta en marcha.
4. Termostato.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE BAÑOS TERMOSTATICOS SERIE BA	Código: ALI -01 -IE. 02
		Página 2 de 4
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:



III. PROCEDIMIENTO

1. Llenar el baño de líquido, asegurándose siempre de que su nivel este por encima de la resistencia del equipo
2. Conectar el baño a la red.
3. Poner el interruptor de puesta en marcha en la posición I
4. Girar el mando del termostato hasta la temperatura a la que se desea trabajar. A la vez se encenderá el piloto de funcionamiento de la resistencia.
5. Durante el periodo de calentamiento del líquido, el piloto ámbar permanecerá encendido el funcionamiento de la resistencia.
6. Una vez alcanzada la temperatura de trabajo, el piloto ámbar se apagará, encendiéndose y apagándose aleatoriamente (Según las perdidas de calor) para mantener estable la temperatura de trabajo.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE BAÑOS TERMOSTATICOS SERIE BA	Código: ALI –01 –IE. 02
		Página 3 de 4
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

IV LIMPIEZA DEL EQUIPO

Para la limpieza de los Baños Termostáticos se recomienda lo siguiente:

- Retirar el líquido del baño después de su uso.

V. TERMINOS Y DEFINICIONES

- Termostato: Aparato que mantiene constante una temperatura determinada de forma automática ⁽¹²⁾.

VI. BIBLIOGRAFIA Y/O DOCUMENTOS DE REFERENCIA

Manual de uso, Baños Termostáticos Serie BA, Bunsen, S.A. 1999, pag. 18, 22-25, 41-46 ⁽²⁾

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE AGITADOR ELECTRICICO	Código: ALI –01 –IE. 03
		Página 1 de 7
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

I. INTRODUCCION

Los agitadores de HEIDOLPH RZR 2020 y RZR 2021 son de fácil manejo y han sido diseñados para su uso específico en el Laboratorio. Como unidad motriz han sido equipados de un motor de condensador con engranaje infinitamente regulable.

La amplia gama de revoluciones se obtiene mediante un engranaje de dos fases, los elementos empleados no requieren mantenimiento alguno y prácticamente no tienen desgaste.

II. ESPECIFICACIONES Y PARTES DEL EQUIPO

ESPECIFICACIONES

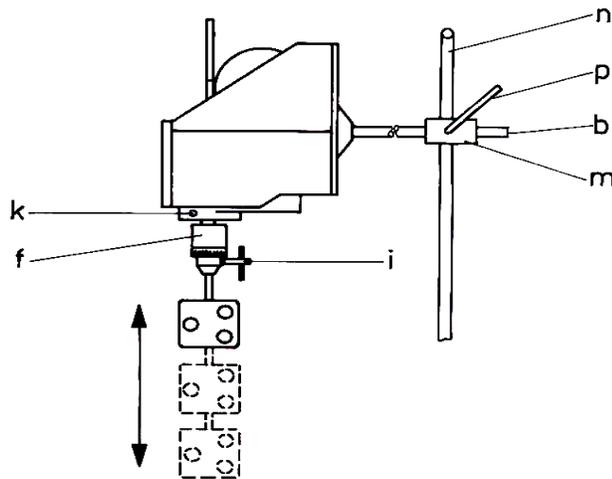
- a. Voltaje de 230V +/-6%, +/-10%.
- b. Temperatura de 0-40 °C.
- c. Humedad ambiental de 95% (sin condensación).
- d. Dos campos de revoluciones, campo 1: 40-400rpm y campo 2: 200-2000 rpm.

PARTES DEL EQUIPO Y ACCESORIOS

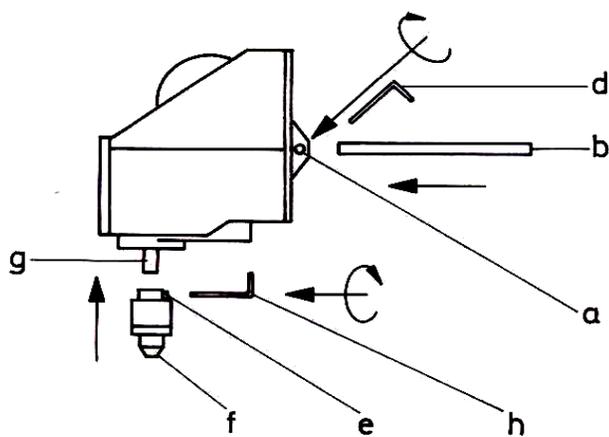
- Tornillo de sujeción (a)
- Barra de soporte (b)
- Llave hexagonal de 3mm (d)

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE AGITADOR ELECTRICICO	Código: ALI -01 -IE. 03
		Página 2 de 7
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

- Tornillo (e)
- Porta varillas (f)
- Árbol de acondicionamiento hueco (g)
- Llave de 2.5mm (h)
- Caja (k)
- Abrazadera (m)

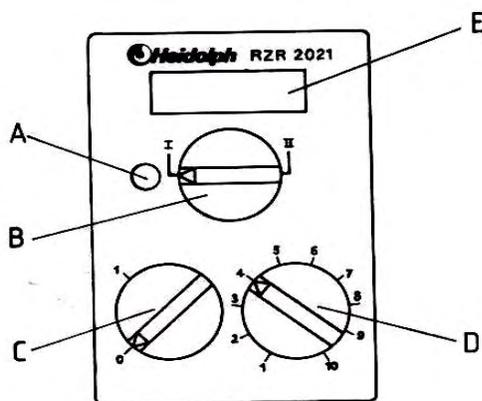
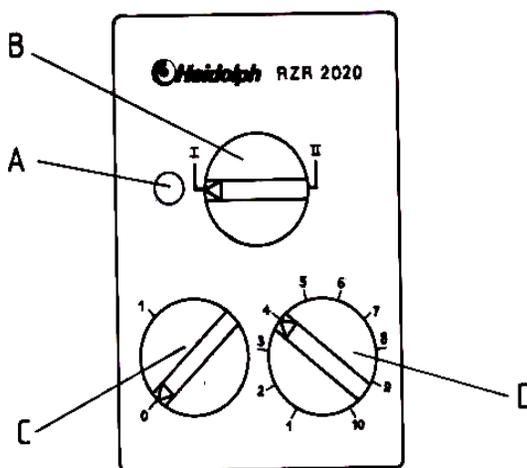


	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE AGITADOR ELECTRICICO	Código: ALI -01 -IE. 03
		Página 3 de 7
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:



- Luz piloto LED (A)
- Botón giratorio que selecciona el campo (B)
- Interruptor ON/OFF (C)
- Botón regulador de velocidad (D)

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE AGITADOR ELECTRICO	Código: ALI -01 -IE. 03
		Página 4 de 7
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:



III. PROCEDIMIENTO

1. Conectar el agitador solo en un enchufe con toma de tierra.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE AGITADOR ELECTRICO	Código: ALI –01 –IE. 03
		Página 5 de 7
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

2. Poner en marcha el aparato accionando el interruptor giratorio ON/OFF (C).
3. Tan pronto como el aparato esté listo para su funcionamiento, se encenderá la luz piloto (A) verde.
4. El botón giratorio (B) permite seleccionar los campos I (40-400 rpm) o (200-2000 rpm).
5. Con el botón giratorio (D) se selecciona la velocidad deseada dentro del campo I ó II mediante una graduación indicada por puntos de referencia (1-10)
 - Si se intenta pasar el campo I al II o viceversa, hallándose el aparato en marcha, el motor se apagará automáticamente y la luz piloto (A) se encenderá en rojo. El cambio correcto es el siguiente:
 1. Para el agitador operando el interruptor (C) ON/OFF.
 2. Girar el botón regulador de la velocidad (D) hasta su tope izquierdo.
 3. Emplear el botón (B) para pasar del campo I al campo II (o viceversa), poner de nuevo en marcha el aparato con el interruptor (C) ON/OFF.
 4. Reajustar las revoluciones deseadas con el botón regulador (D).

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE AGITADOR ELECTRICICO	Código: ALI –01 –IE. 03
		Página 6 de 7
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

IV. LIMPIEZA DEL EQUIPO

- Emplear jabón suave para limpiar la caja y superficie del aparato con la ayuda de un paño húmedo.
- Almacenar el aparato en su embalaje original, o en caso de que este faltará, envolturas similares para evitar daños durante el transporte.
- El aparato deberá almacenarse en lugar seco.

V. TERMINOS Y DEFINICIONES

- Voltaje: Numero de voltios necesarios para el funcionamiento de una lámpara o de cualquier otro aparato eléctrico.⁽⁹⁾
- Revolución: vuelta completa de una pieza móvil alrededor de un eje.⁽¹³⁾
- rpm: Revoluciones por minuto. .⁽⁹⁾

VI. BIBLIOGRAFIA Y/O DOCUMENTO DE REFERENCIA

Manual de Instrucciones Heidolph Instrument GmbH & Co. KG. Service Department. Germany. 1999.⁽¹⁸⁾

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE CAMARA DE FLUJO LAMINAR VERTICAL	Código: ALI -01 -IE. 04
		Página 1 de 8
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

I. INTRODUCCION

Las Cabinas de Flujo Laminar Vertical están equipadas con ventiladores, centrifugas de alta eficacia con sistema automático de regulación de velocidad. El aire impulsado por estos ventiladores es descargados en cámara o plenum y a través del filtro absoluto HEPA es filtrado y en régimen laminar entra en la zona de trabajo, obteniéndose la clase 100.

II. ESPECIFICACIONES Y PARTES DEL EQUIPO

ESPECIFICACIONES

- Dimensiones externas:
 - a. Largo: 11,565 mm
 - b. Ancho: 845 mm
 - c. Alto: 1,290 mm
- Dimensiones internas
 - a. Largo: 1,535 mm
 - b. Ancho: 670 mm
 - c. Alto: 700 mm
 - d. Caudal / vel. Aire: 1,300 - 0.40 m³ / 1,600 - 0.4 n.m/s
 - e. Potencia / peso: 1.0W / 160-170 Kg.
 - f. Iluminación: >800 lux

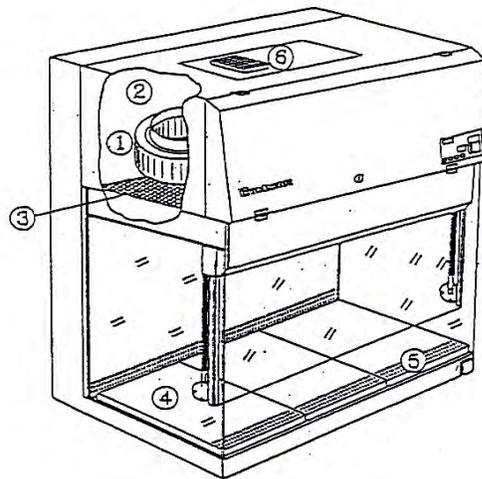
	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE CAMARA DE FLUJO LAMINAR VERTICAL	Código: ALI -01 -IE. 04
		Página 2 de 8
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

- g. Nivel ruido: <60 db
- h. Filtros: HEPA/ULPA H14, Eficiencia > 99.99% (DOP) clase 1
- i. Ventiladores: Centrífuga de alta eficacia con regulación de velocidad alimenticia.

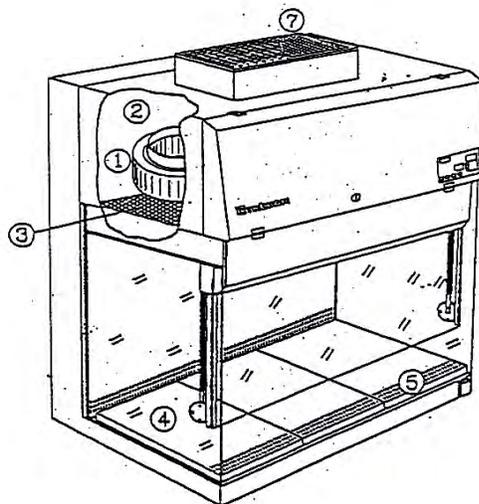
PARTES DEL EQUIPO

1. ventiladores centrífugos de alta eficacia
2. Cámara o plenum
3. Filtro absoluto HEPA
4. Zona de trabajo
5. Entrada de aire exterior y barrera de protección
6. Prefiltro en la extracción del aire
7. Filtro absoluto HEPA en la extracción del aire.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE CAMARA DE FLUJO LAMINAR VERTICAL	Código: ALI -01 -IE. 04
		Página 3 de 8
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:



SERIE - 100

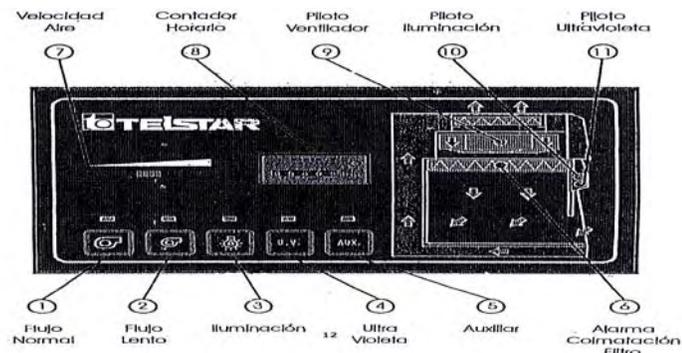


SERIE - 30/70

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE CAMARA DE FLUJO LAMINAR VERTICAL	Código: ALI -01 -IE. 04
		Página 4 de 8
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

PARTES DE LA CARATULA DE MANDOS

1. Pulsador “Flujo Normal”
2. Pulsador “Flujo Lento”
3. Pulsador “Iluminación”
4. Pulsador “Ultravioleta”
5. Pulsador “Auxiliar”
6. Alarma (opcional)
7. Regleta luminiscente (opcional)
8. Contador horario
9. Piloto ventilador
10. Piloto iluminación
11. Piloto ultravioleta



	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE CAMARA DE FLUJO LAMINAR VERTICAL	Código: ALI –01 –IE. 04
		Página 5 de 8
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

III. PROCEDIMIENTO

EN LA PRIMERA CONEXION

1. Antes de conectarla a la red eléctrica, se procederá a una limpieza general con la finalidad de eliminar las partículas de polvo acumulado.
2. Efectuar conexión eléctrica adecuada.
3. Antes de trabajar por primera vez, poner en funcionamiento la Cabina de para purgar los filtros, dejando ésta en marcha durante 6 horas.

PUESTA EN MARCHA

4. Accionar el interruptor de flujo (1) para poner en marcha el equipo, procurando que este libre la zona de aspiración de aire.
5. Dejar en marcha la cabina unos 10 minutos antes de empezar a trabajar en ellos.

DESCONEXION

6. Para proceder al paro de la cabina accionar el interruptor (i) sobre la posición de paro.
7. En el caso de parada prolongada, evitar en lo posible la entrada de polvo ambiental y al emprender de nuevo el trabajo, se deberá actuar como si fuera la primera vez.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE CAMARA DE FLUJO LAMINAR VERTICAL	Código: ALI –01 –IE. 04
		Página 6 de 8
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

IV. LIMPIEZA DEL EQUIPO

- Para la limpieza de la mesa de trabajo y de cristales laterales, utilizar tejidos estériles o de un solo uso, que no desprenda partículas ni fibras.
- Para la desinfección se utilizarán tejidos ligeramente húmedos con solución desinfectante, que no perjudique o altere el lacado de la pintura, el acero inoxidable o los cristales.
- La limpieza de la cabina se debe realizar en las siguientes ocasiones:
 - Antes de empezar cualquier operación.
 - Una vez finalizado el trabajo.
 - Siempre que cambie el programa de trabajo
 - Al derramarse algún líquido en la mesa de trabajo

PARA EL MANTENIMIENTO

OPERACIÓN	PERIODICIDAD
Validación y control de fugas/normas	Mínimo una vez al año
Limpieza del prefiltro de la extracción de aire.	Cada 500 horas
Sustitución del prefiltro de la extracción del aire.	Cada 1000 horas de trabajo o 1 vez al año.
Sustitución de los filtros absolutos de impulsión y extracción.	Cada 3000/4000 horas de trabajo.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE CAMARA DE FLUJO LAMINAR VERTICAL	Código: ALI –01 –IE. 04
		Página 7 de 8
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

V. TERMINOS Y DEFINICIONES

- Filtro: Aparato a través del cual se hace pasar un fluido para eliminar las partículas sólidas en suspensión.⁽¹²⁾
- Filtración: Procedimiento que consiste en retener partículas sólidas por medio de una barrera, la cual puede consistir de mallas, fibras, material poroso o un relleno sólido.⁽¹²⁾

VI. BIBLIOGRAFIA Y/O DOCUMENTOS DE REFERENCIA

Manual de Instrucciones y Funcionamiento de Cabinas Estériles por Flujo Laminar Vertical TELSTAR INDUSTRIAL, S.L., España.2000. ⁽³⁰⁾

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DEL BAÑO TERMOSTATICO	Código: ALI –01 –IE. 05
		Página 1 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

I. INTRODUCCION

El Baño Termostático modelo BAD-6, trabaja en las condiciones que se mencionan mas adelante, al mismo tiempo ofrece cuatro tipos de funciones que pueden utilizarse al momento de hacer uso del mismo.

II. ESPECIFICACIONES Y PARTES DEL EQUIPO

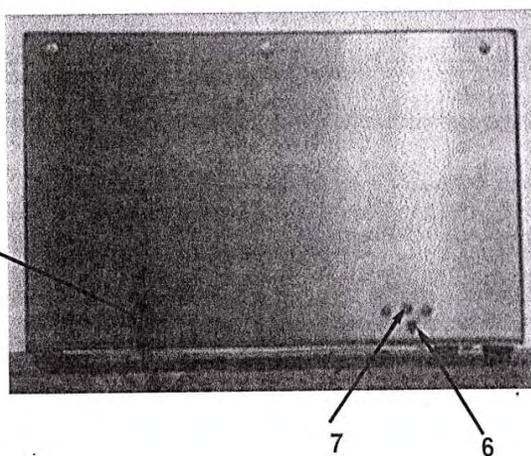
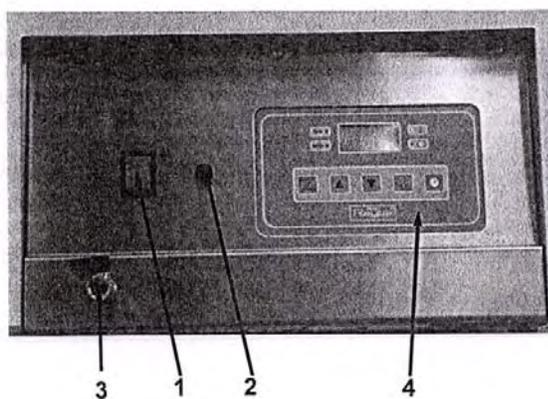
ESPECIFICACIONES

- a. Rango de temperatura: desde temperatura ambiente +5°C hasta 99.9 °C.
- b. Estabilidad de Temperatura: ± 0.15 °C.
- c. Frecuencia Neta: 50/60 Hz.
- d. Consumo 1,600 w.

PARTES DEL EQUIPO

1. Botón principal
2. Alarma indicadora
3. desagüe.
4. Microprocesador controlador de tiempo y temperatura
5. Alambres principales de electricidad
6. Botón trasero de seguridad del termostato.
7. Eje de regulación para seguridad del Termostato.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DEL BAÑO TERMOSTÁTICO	Código: ALI -01 -IE. 05
		Página 2 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

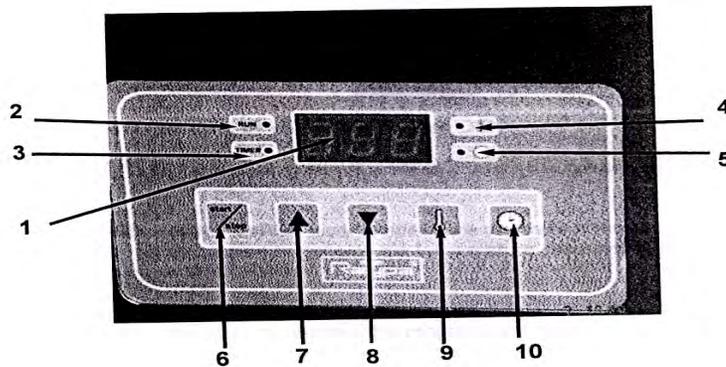


PARTES DEL MICROPROCESADOR

1. Pantalla de la temperatura
2. Piloto indicador de la corrida
3. Piloto indicador del Tiempo

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DEL BAÑO TERMOSTÁTICO	Código: ALI -01 -IE. 05
		Página 3 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

4. Piloto indicador del termómetro
5. Piloto indicador del reloj
6. Llave “encendido/apagado.”
7. Llave de “subir”
8. Llave “bajar”
9. Llave del termómetro
10. Llave del reloj.



III. PROCEDIMIENTO

- TIPOS DE FUNCIONES

El Equipo puede trabajar en cuatros diferentes formas:

1. TIPO NORMAL: El equipo trabajará solo manteniendo la temperatura y durante tiempo indefinido.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DEL BAÑO TERMOSTÁTICO	Código: ALI –01 –IE. 05
		Página 4 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

2. **COMIENZO RETARDADO:** La temperatura de trabajo y el tiempo retardado para la conexión pueden ser programados para el equipo, al ejecutar la temperatura programada, automáticamente después que el tiempo retardado programado ha transcurrido.
 3. **TIEMPO DE MANTENIMIENTO DE LA TEMPERATURA PROGRAMADA:** En esta modalidad, es posible programar el tiempo para mantener la temperatura programada durante el tiempo programado y al terminar ese tiempo, automáticamente se detiene el equipo.
 4. **TIEMPO DE ESPERA, TIEMPO DE MANTENIMIENTO Y TEMPERATURA PROGRAMADA:** En esta modalidad es posible programar el tiempo de espera cuando se comienza, la temperatura de trabajo, el tiempo programado de la temperatura de mantenimiento y la finalización del equipo.
- **EDICION DEL FUNCIONAMIENTO DE LAS MODALIDADES:**
- Para editar el valor de la temperatura deseada, tiempo de espera y tiempo de mantenimiento, debe activarse el switch 1 o botón principal y detenerse el Controlador de la temperatura (apagar el piloto

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DEL BAÑO TERMOSTÁTICO	Código: ALI –01 –IE. 05
		Página 5 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

indicador de la corrida) Para ello, presionar la llave “encendido / apagado” durante un segundo.

- **PARA ASIGNAR TEMPERATURA PROGRAMADA:**

1. Presione la llave del termómetro para entrar la temperatura, el piloto del termómetro se iluminará intermitentemente y en la pantalla aparecerá el valor programado.
2. Para modificar el valor, presionar las llaves de subir y bajar hasta que aparezca el valor deseado en grados. El límite de la edición depende del límite de la escala.
3. Si el valor consignado ha sido modificado aparecerá parpadeante.
4. Si desea guardar el valor modificado, presionar otra vez la llave del termómetro, se regresará al modo inicial.
5. Si se quiere dejar la edición sin mantener el valor modificado, presionar la llave del reloj, la llave encendido / apagado o dejar correr el tiempo por 10 segundos.

- **PROGRAMACION DEL TIEMPO RETARDADO:**

1. Presionar la llave del reloj dos veces para introducir la edición del tiempo de espera.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DEL BAÑO TERMOSTÁTICO	Código: ALI –01 –IE. 05
		Página 6 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

2. El piloto del tiempo se iluminará intermitentemente y aparecerá el valor programado.
 3. Para modificarlo se debe presionar la llave subir / bajar, hasta que aparezca el valor deseado.
 4. Para mantener el valor modificado, presionar de nuevo la llave del reloj, una vez.
 5. Si se quiere abandonar la edición sin guardar el valor modificado, presionar la llave del termómetro, la llave encendido / apagado o permitir correr el tiempo 10 segundos.
- ENCENDIDO:
1. Conectar el equipo del sistema eléctrico.
 2. Activar el swith general (1); se mantendrá iluminado. Después de 10 segundos, el microprocesador indicará la temperatura del equipo.
 3. Si se han programado, la temperatura de trabajo, tiempo de espera o tiempo de mantenimiento de la temperatura programada, presionar la llave encendido / apagado durante 1 segundo, el piloto de la corrida se iluminará comenzando el ciclo programado.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DEL BAÑO TERMOSTÁTICO	Código: ALI –01 –IE. 05
		Página 7 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

4. Una vez ha sido lograda la temperatura, el piloto del termómetro hará encendido y apagado del ciclo, manteniendo la temperatura programada.
5. Si el tiempo retardado ha sido programado, mientras el tiempo de espera es ejecutado, el piloto del tiempo se iluminará, terminando el tiempo, el piloto se apagará y el controlador comenzará la regulación para lograr la temperatura programada.
6. Si el tiempo de mantenimiento ha sido programado, una vez se logre la temperatura programada, el piloto del reloj se iluminará y la cuenta regresiva de mantenimiento comenzará. Una vez llegue al final, los pilotos del reloj de regulación y de la corrida se apagarán.
7. Si se ha programado el apagado del tiempo de mantenimiento, el piloto del reloj se mantendrá siempre encendido.
8. Para apagar la regulación, proceder de la misma forma que al inicio, presionar el encendido / apagado durante 1 segundo.
9. Para apagar completamente el equipo, presionar el switch general (1) hasta la posición cero.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DEL BAÑO TERMOSTATICO	Código: ALI –01 –IE. 05
		Página 8 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

- PARA ASEGURAR EL TERMOSTATO:

1. Si el termostato está ya ajustado a la temperatura de trabajo del baño, se podría desconectar el baño en caso que falle la regulación del termostato o falte líquido.
2. Si se desea protección especial contra un sobrecalentamiento, se debe ajustar el termostato correctamente a una temperatura mayor que la temperatura de trabajo seleccionada lo que se logra de la siguiente manera:
 - a.) Después que se ha estabilizado la temperatura seleccionada, girar lentamente en sentido contrario a las agujas del reloj con un desatornillador, el eje de ajuste (7) hasta que se encienda la luz roja del piloto.
 - b.) Girar nuevamente el eje del ajuste pero en esta ocasión en el sentido de las agujas del reloj unos 2 ó 3 mm. Aproximadamente.
 - c.) Presione el botón de seguridad del termostato (6) y la alarma indicadora se apagará de esta manera la temperatura ajustada será 5°C arriba de la temperatura de trabajo.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DEL BAÑO TERMOSTÁTICO	Código: ALI –01 –IE. 05
		Página 9 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

IV. LIMPIEZA DEL EQUIPO

Para la limpieza de los baños termostáticos se recomienda lo siguiente.

- Retirar el líquido del baño después de su uso.

V. TERMINOS Y DEFINICIONES

- Termostato: Aparato que mantiene constante una temperatura determinada de forma constante.⁽¹³⁾
- Desagüe: Red de tuberías que sirven para desalojar aguas residuales y conducirlas al exterior para ser entregadas al alcantarillado público o al colector principal.⁽²⁹⁾
- Piloto: Pequeña lámpara que sirve para indicar el funcionamiento de un aparato.⁽⁹⁾

VI. BIBLIOGRAFIA Y/O DOCUMENTOS DE REFERENCIA

Manual de Instrucciones para uso y mantenimiento de Baños Termostáticos.

R. Espinar S.L. RAYPA Bad/Bod 11/01. <http://www.cecot.es/raypa>.⁽²⁶⁾

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE INCUBADOR POR CO₂	Código: ALI –01 –IE. 06
		Página 1 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

I. INTRODUCCIÓN

Los incubadores por CO₂ son uno de los equipos mas utilizados ya que estos proporcionan un medio controlado que induce el desarrollo y replicación de determinadas células bajo estas condiciones. Para estos equipos el porcentaje de CO₂ es regulable ya que permite trabajar en un rango de 0 al 20% favoreciendo dicho crecimiento.

II. ESPECIFICACIONES Y PARTES DEL EQUIPO.

ESPECIFICACIONES.

- a. Temperatura desde +7°C hasta 59.9°C.
- b. Rango de CO₂ regulable desde 0 hasta 20 %
- c. Humedad interior de 95%.

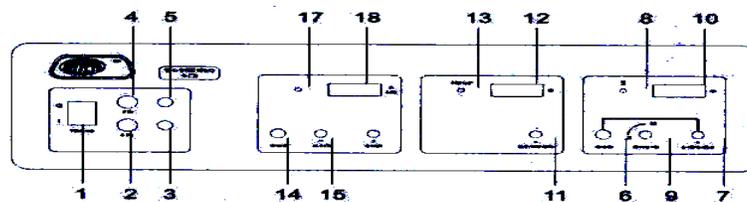
PARTES DEL EQUIPO

A) PANEL DE MANDOS

1. Interruptor general (power)
2. Interruptor entrada CO₂ (GAS)
3. Indicador Óptico Entrada CO₂
4. Interruptor Aireación Interna (AIRE)
5. Indicador Óptico Aireación Interna
6. Pulsador para Visualizar la Temperatura Seleccionada (TEST)

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE INCUBADOR POR CO₂	Código: ALI -01 -IE. 06
		Página 2 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

7. Selector de la Temperatura de Trabajo (SELECTOR)
8. Indicador Óptica de Funcionamiento de los Calefactores
9. Mando Ajuste (1°C) de Temperatura (OFFSET)
10. Display Indicador de su Temperatura
11. Selector de la Temperatura de Seguridad (OVERTEMP)
12. Display Indicador de la Temperatura de seguridad
13. Indicador Óptico del Funcionamiento del Regulador de Seguridad
(ALARM)
14. Pulsador para Visualizar el % de CO₂ Seleccionado (TEST)
15. Selector del % de CO₂
16. Selector de Referencia del CO₂ (ZERO)
17. Indicador Óptico del Funcionamiento del CO₂
18. Display Indicador del % de CO₂
19. Récord para toma de Muestra de la Atmósfera Interior



4000628

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE INCUBADOR POR CO₂	Código: ALI –01 –IE. 06
		Página 3 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

III. PROCEDIMIENTO

Colocar agua destilada directamente sobre el fondo del receptáculo del incubador asegurándose de que el tapón roscado del desagüe esta cerrado y no gotee.

CONEXION DE LA BOTELLA DE CO₂

La botella de CO₂ debe estar preparada con dos manómetros. El primero de ellos; el mas próximo a la botella, servirá para indicar la presión del gas.

Almacenado en la misma, y debe comprobarse periódicamente para evitar quedarse sin gas.

El segundo debe regularse a través del manorreductor para mantener una presión de salida entre 0.5 y 1 bar. Máximo.

Para conseguir un funcionamiento óptimo del % de CO₂, esta presión de salida debe ser continúa, ya que diferencias superiores a 1 bar. Puede alterar el % de CO₂ interior del incubador.

Conectar la botella de CO₂ a través del manorreductor al terminal posterior mediante el tubo de plástico y sus correspondientes abrasadores que se incluyen sueltos en el aparato.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE INCUBADOR POR CO₂	Código: ALI –01 –IE. 06
		Página 4 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

A.) SELECCIÓN DE LA TEMPERATURA DE TRABAJO.

1. Accionar el interruptor general (1) y los display indicadores de temperatura (10), OVERTEMP (12) y CO₂ (18) deben iluminarse
2. Verificar que los indicadores ópticos 3 y 5 permanecen apagados; en caso contrario, accionar los interruptores 2 y 4
3. La selección de la temperatura se efectúa mediante el pulsador TEST(6) y el mando SELECTOR (7). Dicho mando esta previsto de una palanquita de bloqueo, para que una vez seleccionada la temperatura de trabajo, esta no pueda modificarse involuntariamente.
4. Para seleccionar la temperatura desbloquear primero el mando SELECTOR (7), presionar el pulsador TEST (6) y aparecerá en el display (10) la temperatura de selección.
5. Manteniendo el pulsador TEST(6) presionado, girar el mando SELECTOR (7) a la derecha o izquierda hasta visualizar en el display (10) la temperatura de trabajo deseada, bloquear seguidamente el mando selector (7).
6. Dejar de presionar el pulsador TEST (6) y el display visualizara la temperatura del interior del incubador

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE INCUBADOR POR CO₂	Código: ALI –01 –IE. 06
		Página 5 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

7. La lectura del display irá aumentando progresivamente hasta alcanzar la temperatura prefijada anteriormente y se observará que el indicador óptico de señalización de los calefactores (8) ira efectuando unos pulsos cuya duración es proporcional a la diferencia de temperatura real y prefijada.
8. Si desea saber la temperatura seleccionada, presionar el pulsador TEST (6) y esta aparecerá en el display
9. Una vez que la temperatura interna del incubador se haya estabilizado (aprox. 4hrs. A 37°C) y en caso de que esta temperatura difiera en algunas décimas a la seleccionada, moviendo los mandos de ajuste FOCET (9) hacia la derecha (+) o izquierda (-) conseguiremos el ajuste óptimo de la temperatura al cabo de un tiempo.

B.) SELECTOR DE LA TEMPERATURA DE SEGURIDAD

1. Esta temperatura deberá ser seleccionada previamente a la operación de selección de temperatura de trabajo.
2. Para seleccionarla, desbloquear el selector de temperatura de seguridad OVERTEMP(11) luego girar dicho mando hasta que el display (12) indique la temperatura de seguridad que deseamos

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE INCUBADOR POR CO₂	Código: ALI –01 –IE. 06
		Página 6 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

seleccionar (normalmente 0.5⁰C por encima de la temperatura de trabajo.) y después volver a bloquear el selector OVERTEMP(11)

3. Durante la estabilización de la temperatura de trabajo observarán que el indicador óptico ALARM (13) se ilumina indicando que la temperatura del incubador esta por encima de la temperatura de seguridad OVERTEMP. (Este fenómeno puede ocurrir varias veces durante el periodo de estabilización de temperatura del incubador; cuando el incubador permanezca abierto cierto tiempo, por Ej: durante la carga del material.)
4. En caso de avería del circuito de regulación principal y de que este no controlara la temperatura del incubador, el circuito de seguridad OVERTEMP asumiría las funciones de regulador.

C.) SELECCIÓN DE LA MEZCLA DE CO₂

1. Cuando la temperatura del incubador este estabilizada (NO ANTES), proceder al ajuste de la referencia de CO₂
2. Desbloquear los mandos zero (16) y % CO₂ (15) girando el mando zero (16) hasta que el display indicador de CO₂ (18) indique 0,00%.
3. Bloquear el mando zero.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE INCUBADOR POR CO₂	Código: ALI –01 –IE. 06
		Página 7 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

4. Una vez conseguida la referencia 0%, presionar el pulsador TEST (14) y girar el mando % CO₂ hasta leer en el display indicador de CO₂ el % de CO₂ que desean seleccionar.
5. Bloquear el mando % CO₂, dejar de presionar el pulsador TEST (14) siempre desee saber, la concentración de CO₂ que hemos seleccionado, bastará presionar el pulsador TEST (14) y la misma aparecerá en el display.
6. Accionar el interruptor de entrada CO₂ GAS (2) y al mismo tiempo se iluminará el indicador óptico de puesta en marcha de CO₂ (3).
7. Cuando el incubador alcance la concentración de gas seleccionada, el suministro de gas se interrumpirá automáticamente y podremos leerla
8. En el display % CO₂ (18). Teniendo ya el incubador preparado para trabajar.

D.) INSTRUCCIONES PARA VERIFICAR EL % DE CO₂.

1. Cerrar a través del interruptor GAS (2) la entrada de CO₂
2. A los 2 minutos de haber cerrado la entrada de CO₂ (2) proceder a medir el % de CO₂, siguiendo las instrucciones del aparato medidor que se emplee.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE INCUBADOR POR CO₂	Código: ALI –01 –IE. 06
		Página 8 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

3. Una vez efectuada la medición, abrir nuevamente la entrada de CO₂ (2).

IV. LIMPIEZA DEL EQUIPO

- Si el incubador permanece fuera de servicio por un largo periodo de tiempo, el agua del interior debe vaciarse por el tubo de desagüe (20)
- El interior de la cámara deberá secarse concienzudamente con un paño, dejando unas horas las puertas abiertas, de no realizarse esta operación, la formación de óxidos y contaminación pueden dañar seriamente los elementos sensores del aparato, imposibilitando, en algún caso, la nueva puesta en servicio.
- Para la limpieza de las diferentes piezas de los aparatos, recomendamos los siguientes productos:
 - Limpieza del acero inoxidable – Alcohol
 - Limpieza de carátulas y plástico – Alcohol con algodón o con un paño no abrasivo.

V. TERMINOS Y DEFINICIONES

- Incubación: periodo de tiempo requerido para inducir el desarrollo y replicación de las células de tejidos o microorganismos en un medio de cultivo o algún otro medio especial de laboratorio.⁽²⁵⁾

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE INCUBADOR POR CO₂	Código: ALI –01 –IE. 06
		Página 9 de 10
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

- Incubadora: aparato que se utiliza para proporcionar un medio controlado, especialmente en lo referente a la temperatura. También se pueden controlar otros componentes ambientales como la oscuridad, la luz, el oxígeno, la humedad.⁽²⁵⁾

VI. BIBLIOGRAFÍA Y/O DOCUMENTOS DE REFERENCIA

Manual de instrucciones código 80036 A 28/06/00 J. P. Selecta SA
(Barcelona) España. <http://www.sefes.es/selecta>.⁽²³⁾

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE ARMARIOS REFRIGERADORES	Código: ALI –01 –IE. 07
		Página 1 de 8
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

I. INTRODUCCIÓN

Los Armarios Refrigeradores están especialmente indicados para ser utilizados en la determinación de la Demanda Biológica de Oxígeno (DBO_5) a 20 °C. , la medida de actividad enzimático a 25 °C, la conservación de muestras, incubación, cosmética, botánica, alimentación, etc.

II. ESPECIFICACIONES Y PARTES DEL EQUIPO

ESPECIFICACIONES

- a. Temperaturas regulables desde +2⁰C hasta +40⁰C
- b. Estabilidad de $\pm 1.25\%$

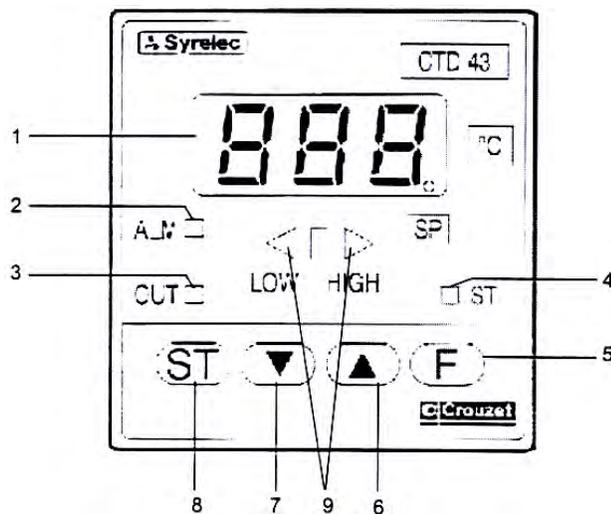
PARTES DEL EQUIPO

A PANEL DE MANDOS.

1. Display rojo de la medición (o de la consigna para CTD 43 accionando la tecla ▲, indicado por un punto decimal intermitente.
2. LED rojo indica que la salida de alarma esta activa
3. LED rojo indica que la salida esta activada.
4. LED verde de la indicación de la función auto-regulable (indicador intermitente) y auto-adaptativo (el indicador esta iluminado permanente) verde.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE ARMARIOS REFRIGERADORES	Código: ALI -01 -IE. 07
		Página 2 de 8
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

5. Tecla de selección y validación de los parámetros.
6. Tecla de incrementación y modificación de los parámetros
7. Tecla de decrementación y modificación de los parámetros
8. Activa o desactiva las funciones auto-regulable y auto-adaptativa (función Smart.)
9. Indicador de desviación con relación al punto de consigna, central verde inferior y superior rojo.



	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE ARMARIOS REFRIGERADORES	Código: ALI –01 –IE. 07
		Página 3 de 8
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

III. PROCEDIMIENTO.

Accionar el interruptor de puesta en marcha situado en la parte posterior, y al mismo tiempo se encenderá el controlador de temperatura.

A.) TEMPERATURA DE CONSIGNA.

Para acceder directamente a la consigna con el fin de modificar:

- 1.) Pulsar durante más de tres segundos sobre ▲ o ▼ para aumentar o disminuir el valor de la consigna en curso.
- 2.) Obtenida la nueva consigna soltar las teclas ▲ o ▼ automáticamente será memorizada y operacional después de tres segundos.
- 3.) Si durante el proceso se decide no modificar la consigna activar la tecla F; se volverá al “modo indicación normal”. Sin haberse memorizado el nuevo valor.

NOTA:

Para tener el valor de la consigna en el display, accionar la tecla ▲; cuando se indique el valor el LED rojo de la derecha del display, indicado por “sp” estará intermitente; para tener de nuevo el valor de la medición en el display, pulsar ▲.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE ARMARIOS REFRIGERADORES	Código: ALI –01 –IE. 07
		Página 4 de 8
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

B.) MODIFICACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL REGULADOR DE TEMPERATURA.

- 1.) El regulador sale de fabrica bloqueado de forma que solo se puede modificar la temperatura de consigna.
- 2.) Si se quiere modificar los parámetros de control primero se habrá de desbloquear de la siguiente forma:
 - a.) Sacar el regulador de su alejamiento del frontal.
 - b.) Procedimiento de configuración.
 - Abrir el aparato
 - Colocar el “Switch” en posición abierta (fig.1)
 - Cerrar el aparato
 - Poner el aparato bajo tensión
 - Aparece en el display “CnF” (Si aparece “Cal” accionar la tecla ▲ para volver al modo configuración)
 - Accionar sobre F para iniciar la configuración,
 - Pulsar hasta que aparezca “P-11’ y colocar a “o”
 - Abrir el aparato
 - Colocar el “Switch” en posición (fig.2)
 - Cerrar el aparato

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE ARMARIOS REFRIGERADORES	Código: ALI -01 -IE. 07
		Página 5 de 8
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

- Poner el aparato bajo tensión
- Proceder al cambio de los parámetros

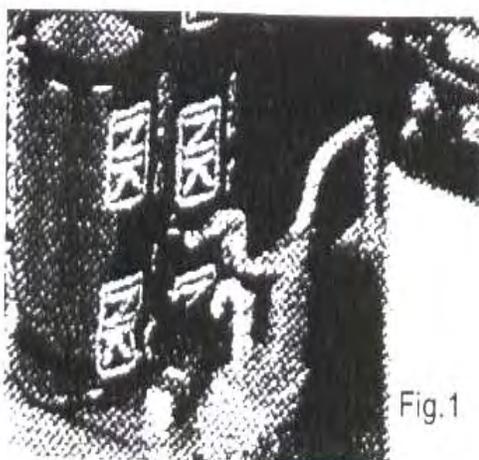


Fig.1

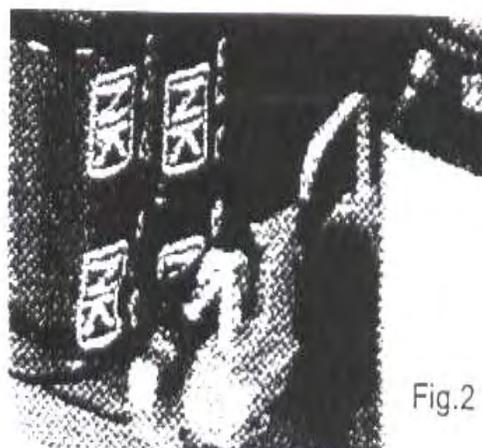


Fig.2

C.) PARÁMETROS DE FABRICACIÓN DEL APARATO.

PARÁMETROS REGULADOR			
P1	4	Sp	19
P2	-1	AL	1
P3	99	HSA	0,5
P4	R	pB	5
P5	3	T1	12
P6	Ha	TD	2
P7	D	IP	30

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE ARMARIOS REFRIGERADORES	Código: ALI –01 –IE. 07
		Página 6 de 8
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

PARÁMETROS REGULADOR			
P8	Off	C	20
P9	1	RL	2
P10	0	RH	40
P11	0	OIH	100
P12	10	Tol	Inf.
P13	2	--	--

IV. LIMPIEZA DEL EQUIPO

- Se recomienda una limpieza regular del armario; colocando el termostato en posición “0” o (desconectar los fusibles)
- Limpiar la cuba y la carrocería con agua tibia y un poco de detergente, enjuagar con agua limpia y secar bien con un paño (Nunca utilizar productos de limpieza con componentes abrasivos o disolventes.)
- Para desescarchar, poner el termostato en la posición “D” o sacar todos los productos y dejar la puerta abierta.
- Luego de desescarlo, limpiar el armario y poner el termostato en posición Inicial (Evitar utilizar objetos cortantes para sacar la capa de escarcha, bajo el peligro de deteriorar el evaporador.)

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE ARMARIOS REFRIGERADORES	Código: ALI –01 –IE. 07
		Página 7 de 8
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

V. TERMINOS Y DEFINICIONES.

- Demanda Biológica de Oxígeno (DBO): es el oxígeno que se consume en un determinado volumen de agua en un plazo fijo de tiempo (5 días) a una temperatura estándar (15 °C.) y en condiciones de oscuridad nos indica la materia orgánica presente en el agua, por que cuanto mas hay, mas activa estarán las bacterias aerobias y mas O₂ se consumirá. Por tanto si la DBO es alta, indica contaminación y mala calidad de esta agua y viceversa ⁽¹²⁾

VI. BIBLIOGRAFÍA Y/O DOCUMENTOS DE REFERENCIA.

Manual de instrucciones código 80104 Rev. E 14/07/99 J.P. selecta S.A.
(Barcelona) España.1999. ⁽²¹⁾

<http://www.sefes.es/selecta>.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE AUTOCLAVE	Código: ALI –01 –IE. 08
		Página 1 de 11
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

I. INTRODUCCION.

Los Autoclaves automáticos para esterilización a vapor saturado son gobernados por un microprocesador con lectura digital de temperatura que controla:

1. Función Prevacuum; purgado del aire de la cámara al inicio del proceso por un doble ciclo de vacío.
2. Detector de tapa bien cerrada.
3. Llenado automático de agua de la cámara.
4. Control de los parámetros de temperatura, presión y tiempo.

II. ESPECIFICACIONES Y PARTES DEL EQUIPO

ESPECIFICACIONES

- a. Temperatura de esterilización desde 105⁰C hasta 134⁰C
- b. Tiempo de esterilización desde 1 min. Hasta 99 min.
- c. Tiempo de secado hasta 60 min.
- d. Tres modalidades de funcionamiento: sólidos, líquidos, y sólidos + Secado.
- e. Diez programas de funcionamiento.

Los programas del 1 al 9 se pueden grabar en función de la necesidad del usuario; el programa cero es libre y no se puede grabar.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE AUTOCLAVE		Código: ALI –01 –IE. 08
			Página 2 de 11
			Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:	

Programa N ₀	Modo	Temperatura / Presión	Tiempo de Esterilización	Tiempo de Secado
1	Sólido	121 °C/1 Bar	30'	-
2	Sólido	126 °C/1.33Bar	20'	-
3	Sólido	134 °C/2Bar	18'	-
4	Sólido	134 °C/2Bar	10'	-
5	Líquido	121 °C/1 Bar	30'	-
6	Sólido +Secado	121 °C/1 Bar	30'	35'
7	Sólido +Secado	126 °C/1.33Bar	20'	35'
8	Sólido +Secado	134 °C/2Bar	18'	35'
9	Sólido +Secado	134 °C/2Bar	10'	35'
0	LIBRE			

PARTES DEL EQUIPO

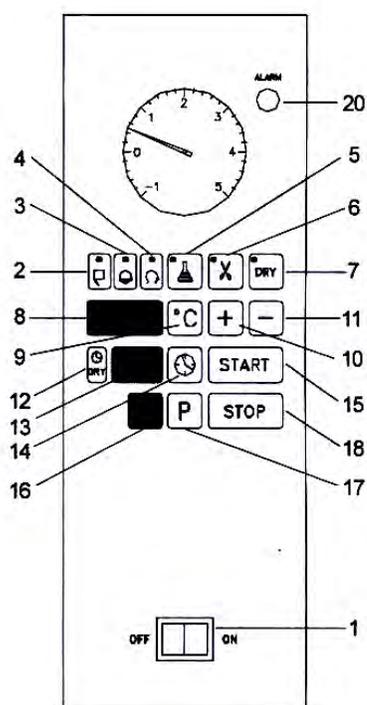
A PANEL DE MANDOS.

1. Interruptor general con indicador luminoso
2. Indicador luminoso de puerta abierta
3. Indicador luminoso de falta de agua
4. Indicador luminoso de final de ciclo

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE AUTOCLAVE	Código: ALI –01 –IE. 08
		Página 3 de 11
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

5. Selector modo líquidos
6. Selector modo sólidos
7. Selector modo sólido + secado
8. Display indicador de temperatura
9. Pulsador de temperatura
10. Pulsador de avance de parámetros
11. Pulsador de retroceso de parámetros
12. Indicador tiempo de secado
13. Display indicador de tiempo
14. Pulsador de tiempo
15. Pulsador de marcha
16. Display indicador del programa
17. Pulsador del programa
18. Pulsador de paro
19. Indicador luminoso de alarma

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE AUTOCLAVE	Código: ALI -01 -IE. 08
		Página 4 de 11
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:



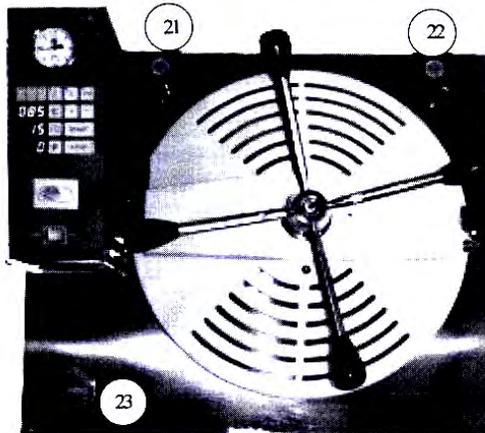
B PARTE SUPERIOR

20. Válvula de llenado

21. Válvula de vaciado de vapor

22. Tapón de llenado del tanque interior

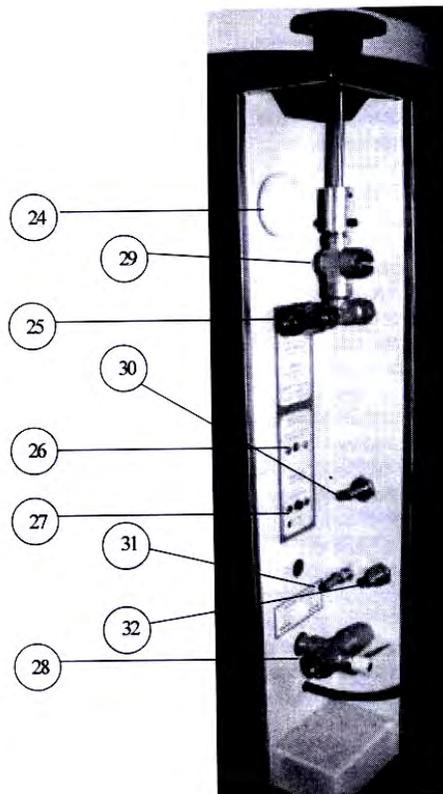
	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE AUTOCLAVE	Código: ALI -01 -IE. 08
		Página 5 de 11
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:



C PARTE TRASERA

- 24. Filtro de aireación
- 25. Válvula de seguridad
- 26. Termostato de regulación secado
- 27. Termostato de seguridad
- 28. Válvula de drenaje
- 29. Válvula de vaciado vapor
- 30. Entrada de agua externa
- 31. Salida condensador
- 32. Salida agua tanque

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE AUTOCLAVE	Código: ALI -01 -IE. 08
		Página 6 de 11
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:



III. PROCEDIMIENTO

1. Poner en marcha mediante el interruptor general (1)
2. Compruebe que esta cerrada la válvula de vapor (22)
3. Colocar el material a esterilizar
4. Cerrar la tapa
5. Programación

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE AUTOCLAVE	Código: ALI –01 –IE. 08
		Página 7 de 11
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

- a) Operación manual (programa 0)
- b) Operación automática (programa del 1 al 9)

A OPERACIÓN MANUAL

Para la programación manual del modo del funcionamiento, temperatura, tiempo de esterilización y tiempo de secado; proceder de la siguiente

Manera:

1. Mediante el pulsador de programas (17) coloque el display de programas a cero
2. Seleccionar el modo de funcionamiento accionando los pulsadores 5, 6 y 7 según se desee; líquidos, sólidos, o sólidos + secado
3. Para seleccionar la temperatura, pulse simultáneamente el pulsador (9) y el pulsador (10) o (11) según se quiera subir o bajar la temperatura de esterilización (vapor programable entre 105°C y 134°C)
4. Para seleccionar el tiempo de esterilización pulse simultáneamente el pulsador (14) y el pulsador (10) o (11) según se quiera subir o bajar el tiempo de esterilización (vapor seleccionable entre 1' y 99')
5. Para seleccionar el tiempo de secado pulse simultáneamente el pulsador (14) dos veces (automáticamente se encenderá el indicador

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE AUTOCLAVE	Código: ALI –01 –IE. 08
		Página 8 de 11
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

(12)) y el pulsador (10) o (11) según se quiera subir o bajar el tiempo de secado (vapor seleccionable entre 1' y 99')

6. Pulse el pulsador de marcha START (15); el indicador del modo seleccionado (5 o 6 o 7 +) se pondrán intermitentes.
7. A partir de este momento quedan inactivos los pulsos de alcance (10), retroceso (11) y de programa (17)
8. En todo momento se podrán observar la temperatura (8) y tiempo (13) prefijados, o pulsando las teclas correspondientes (9 y 14).
9. Transcurrido el tiempo prefijado, se encenderá el indicador (4) de final de ciclo sonará un aviso acústico.
10. Acabado el ciclo pulsar siempre el botón de paro STOP (18).
11. Asegúrese de que no hay presión y abra la válvula de vapor; abrir la tapa.

SEGURIDAD ANTES DE PULSAR START (15)

- a. Verificar que el tiempo es diferente de cero.
- b. Verificar que la temperatura actual es inferior a 100 °C.
- c. Verificar que no existe condición de error.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE AUTOCLAVE	Código: ALI –01 –IE. 08
		Página 9 de 11
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Si no hay agua en la caldera del AUTOCLAVE se encenderá el piloto indicador (3) y permanecerá encendido hasta que no se haya llenado la caldera (el llenado se realiza de forma automática)

B OPERACIÓN AUTOMÁTICA

Se escogerá cualquier programa distinto a “0” pulsando el botón (17) y a continuación pulsar el botón de marcha START (15).

IV. LIMPIEZA DEL EQUIPO

Para la limpieza de las diferentes piezas de los aparatos, recomendamos los siguientes productos.

- Limpieza del acero inoxidable: Alcohol
- Limpieza de carátulas y plásticos: Alcohol con algodón o con un pañuelo no abrasivo.
- Limpieza de tuberías: Cal (mezcla del 50% de sulfamán y del 50% de agua).
- Limpieza del filtro de vaciado de la caldera, situado en la parte inferior del panel frontal.
- Es aconsejable cambiar el agua después de 50 usos ó una vez al mes.
- Antes de quitar la tapa del aparato desconectarlo.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DE AUTOCLAVE		Código: ALI –01 –IE. 08
			Página 10 de 11
			Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:	

V. TERMINOS Y DEFINICIONES

- Autoclave: Aparato que se utiliza para esterilizar el instrumental quirúrgico u otros objetos, mediante vapor a presión. ⁽²⁵⁾
- Esterilización: Técnica cuyo objetivo es destruir los microorganismos por medio del calor, el agua, sustancias químicas o gases. ⁽²⁵⁾
- Esterilización por vapor: Destrucción de las formas de vida microbianas presentes en un objeto mediante la exposición de este a vapor a 121 °C durante 15 minutos. ⁽²⁵⁾

VI. BIBLIOGRAFIA Y/O DOCUMENTOS DE REFERENCIA.

Manual de instrucciones código 80121 Rev C04/07/01, 1999 ⁽²²⁾

J.P. Selecta S.A. (Barcelona) España. <http://www.pselecta.es>.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DE CONTADOR DE COLONIAS COMECTA	Código: ALI –01 –IE. 09
		Página 1 de 5
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

I. INTRODUCCION

El cuenta colonias es un equipo utilizado para obtener un número o cifra aproximada de colonias de bacterias presentes en el medio de cultivo contenido en una placa de petri.

Por medio de él se observan en forma levemente aumentadas las colonias desarrolladas y su diseño, permite efectuarles un conteo que indiquen su crecimiento o no y la cantidad aproximada.

II. ESPECIFICACIONES Y PARTES DEL EQUIPO

ESPECIFICACIONES

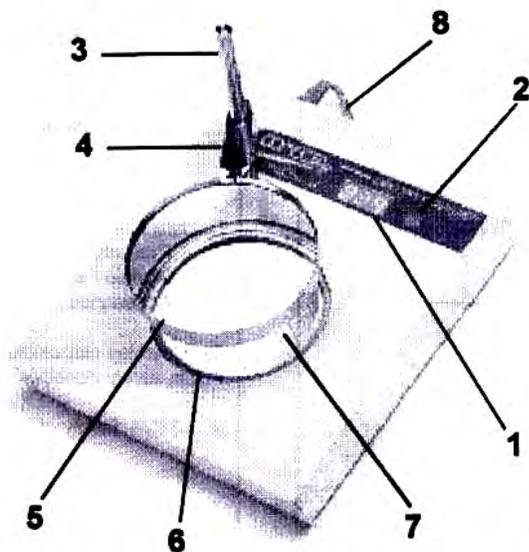
- a. Diámetro de la Lente: 12.5 cm.
- b. Aumento de la Lente: 2X
- c. Diámetro del porta cápsulas: 10cms.
- d. Medidas exteriores: 25X23X30 cms.
- e. Peso: 3.5 Kg.
- f. Consumo: 22 W.

PARTES DEL EQUIPO

1. Display contador 3 dígitos.
2. Puesta de cero.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DE CONTADOR DE COLONIAS COMECTA	Código: ALI -01 -IE. 09
		Página 2 de 5
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

3. Varilla soporte lente.
4. Nuez soporte de la lente
5. Lente de 2X.
6. Base porta - cápsulas.
7. Disco de contaje según Wolffhuegel.
8. Interruptor principal con dos fusibles de 2^a



III. PROCEDIMIENTO

1. Roscar la varilla soporte lente (3) en la base del cuenta colonias

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DE CONTADOR DE COLONIAS COMECTA	Código: ALI –01 –IE. 09
		Página 3 de 5
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

2. Situar la lente (5) en la varilla (3) mediante la nuez de fijación (4). Esta nuez permite un enfoque ajustable en altura de la lente y un giro completo de esta de 360 °.
3. Situar la base (transparente) porta-cápsulas (6).
4. Colocar el disco de contaje Wolffhuegel (7) en la base porta-cápsulas (6)
5. Conectar a la red.
5. Accionar el interruptor principal (8) situado en la parte posterior del aparato.
7. El display (1) debe indicar 000 para empezar a contar, si no es así, pulsar el botón puesta a cero (2).
8. El puntaje se realiza por presión, punteando en la cápsula (6) con cualquier puntero (bolígrafo, punzón, etc.).
9. Una vez realizado el puntaje, pulsar el botón puesta a cero (2).

IV. LIMPIEZA DEL EQUIPO

- Se recomienda una limpieza regular del contador de colonias; empleando una franela o paño que no esparza mota o pelusa.
- Nunca utilizar productos de limpieza con componentes abrasivos o disolventes.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DE CONTADOR DE COLONIAS COMECTA	Código: ALI –01 –IE. 09
		Página 4 de 5
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

V. TERMINOS Y DEFINICIONES

- Colonia: Desarrollo visible microscópicamente de microorganismos en un medio de cultivo sólido.⁽¹⁹⁾

VI. BIBLIOGRAFIA Y/O DOCUMENTOS DE REFERENCIA

Instrucciones de Manejo para Contador de Colonias, Digital - S COMECTA S, A., 2000. ⁽⁴⁾

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DE FREEZERS	Código: ALI –01 –IE. 10
		Página 1 de 7
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

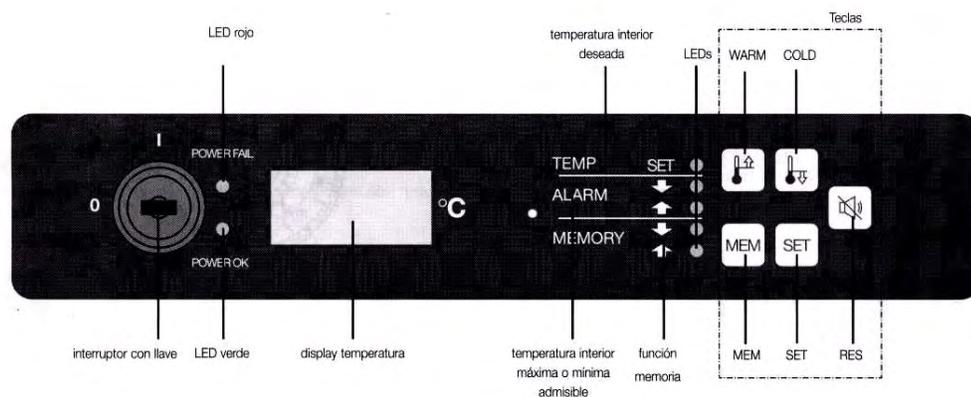
I. INTRODUCCION

El manejo de un frigorífico en un Laboratorio debe efectuarse con todas las instrucciones y advertencias relativas a la seguridad laboral, pues de su buen funcionamiento depende la eficiente conservación de los elementos del Laboratorio que necesiten mantenerse a bajas temperaturas.

II. PARTES DEL EQUIPO

1. Interruptor con llave
2. LED rojo del power fail
3. LED Verde del power ok.
4. Display de la temperatura.
5. Indicador de la temperatura interior deseada TEMP y un LED.
6. Indicador de la temperatura Inferior Máxima o mínima admisible ALARM y dos LED.
7. Función de la memoria MEMORY y dos LED
8. Tecla Warm.
9. Tecla Cold
10. Tecla MEM
11. Tecla SET
12. Tecla RES

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DE FREEZERS	Código: ALI -01 -IE. 10
		Página 2 de 7
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:



III.PROCEDIMIENTO

1. Poner en marcha el aparato girando el interruptor con llave (1) en el cuadro de mandos hasta posición ON, en esta posición se puede sacar la llave para evitar que el aparato sea desconectado involuntariamente.
2. Al ponerlo en marcha se enciende con luz fija durante unos 5 minutos todos los LED; en el display (14) aparece el valor 18.8
3. Posteriormente queda encendido solo el LED verde (3) indicando que el aparato está conectado y sometido a tensión.
4. Aparece en el display la temperatura actual interna del frigorífico que corresponde después de la puesta en marcha a la temperatura ambiente.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DE FREEZERS	Código: ALI -01 -IE. 10
		Página 3 de 7
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

5. Controlar después del primer encendido, el correcto funcionamiento del aparato y si ha alcanzado después de 24 horas la temperatura programada.
6. Al primer encendido la alarma está desactivado hasta que la temperatura interior alcanza el valor programado, solo después la alarma se activará.
7. Si se apaga el aparato utilizando la llave, todos los parámetros vuelven a los valores originales de fábrica.
8. En el Temp - set se lee la temperatura interior programada de fábrica. Para poder detectar el valor, pulsar la tecla SET, el LED se enciende y el valor queda visualizado mientras sigue apretada la tecla SET para el modelo MF 600, el valor es 35 °C. bajo cero.
9. En el display se visualiza la temperatura interior del frigorífico; para el modelo MF 600, aparece la indicación "--"ya que la temperatura programada es superior -60 °C. bajo cero.

Set alarma es la temperatura interior máxima y mínima admisible pulsando las teclas correspondientes WARM y COLD se pueden detectar las Set - alarma programadas. Se encienden los LED correspondientes de Alarma WARM o Alarma COLD mientras se

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DE FREEZERS	Código: ALI –01 –IE. 10
		Página 4 de 7
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

visualiza la temperatura programada. Los valores son: Alarma COLD: -40 °C. Alarma WARM: -30 °C.

11. Para programarlas se procede así:

Para la Alarma COLD se presiona al mismo tiempo las teclas SET y COLD, el LED se enciende y la temperatura va cambiando por etapas de 1°C. Para fijar un valor, es suficiente con soltar las teclas hasta que haya alcanzado el valor deseado. Para la Alarma WARM se procede de igual manera.

12. La alarma se pone en función cuando:

El valor de la temperatura interior no esta dentro del campo programado (Alarma COLD - Alarma WARM)

- Una de las dos temperaturas detectadas no está dentro del campo programado.
- Ambos valores no están dentro del umbral.
- Al llegar a uno de estos puntos, se oirá una alarma sonora, el LED de alarma respectivo (Alarma COLD o Alarma WARM) comenzará a parpadear y se reflejarán las temperaturas a intervalos constantes.

13. Pulsando la tecla RES se interrumpirá la señal acústica pero se sigue visualizando la luz intermitente, los valores de las temperaturas y la

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DE FREEZERS	Código: ALI –01 –IE. 10
		Página 5 de 7
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

función centellante de los dos LEDS, hasta que se elimine la anomalía de las temperaturas, si esto no ocurre dentro de 10 minutos, se vuelve a poner en marcha la alarma acústica.

14. Para visualizar la temperatura máxima y mínima se pueden visualizar con la función MEMORY para ello se pulsa al mismo tiempo las teclas MEM y WARM para la temperatura máxima y MEM y COLD para la mínima.

Se enciende el LED MEMORY -COLD o MEMORY WARM visualizando el valor correspondiente. Para borrar los valores memorizados, pulsar simultáneamente las teclas MEM y RES, se encienden los LEDS Memory y los dos valores se borran.

15. A falta de fluido eléctrico, se apaga el LED verde en el cuadro de mandos y el LED rojo se pone centellante. Además se activa la alarma acústica; que se puede deshabilitar por la tecla RES, durante esta fase, no se visualiza ninguna temperatura en el display. A falta de fluido eléctrico, los datos programados no se pueden modificar ni borrar.

Si durante este período se produce incremento de la temperatura, el LED WARM ALARM y el LED POQER FAIL se pondrán a parpadear.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DE FREEZERS	Código: ALI –01 –IE. 10
		Página 6 de 7
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

IV. LIMPIEZA DEL EQUIPO

- Para la limpieza del frigorífico utilizar productos detergentes delicados, evitar en absoluto el uso de productos químicos o corrosivos, polvos abrasivos, esponjas abrasivas o disolventes químicos.
- Se debe limpiar el condensador dos veces por año mediante un cepillo o una aspiradora. El condensador se encuentra en la parte trasera del equipo.
- Para optimizar la limpieza, descongelar el equipo como se indica en el aseguramiento de la calidad.

V. TERMINOS Y DEFINICIONES.

- Temperatura: Propiedad de los cuerpos que determina los intercambios de calor entre los mismos, y constituye una medida de la energía cinética, medida de las moléculas de los cuerpos.⁽¹⁹⁾

IV. BIBLIOGRAFIA Y/O DOCUMENTOS DE REFERENCIA

Instrucciones de Manejo para Freezers; Ultracold - Freezers Electrolux, Medical Refrigeration. MF 600., 2000. ⁽⁸⁾

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DEL AGITADOR MAGNETICO ELECTRICO AGIMATIC –N	Código: ALI –01 –IE. 11
		Página 1 de 5
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

I. INTRODUCCION

Los AGIMATIC son una serie de agitadores de construcción funcional, con mueble infectado en elección ligera recubierto en epoxi, plato superior de 1450, aro de seguridad y rebosadero en acero inoxidable 18/8

El modelo N dispone de plato calefactor y conector para termómetro de contacto y regulador de temperatura ELECTEMP

II. ESPECIFICACIONES Y PARTES DEL EQUIPO

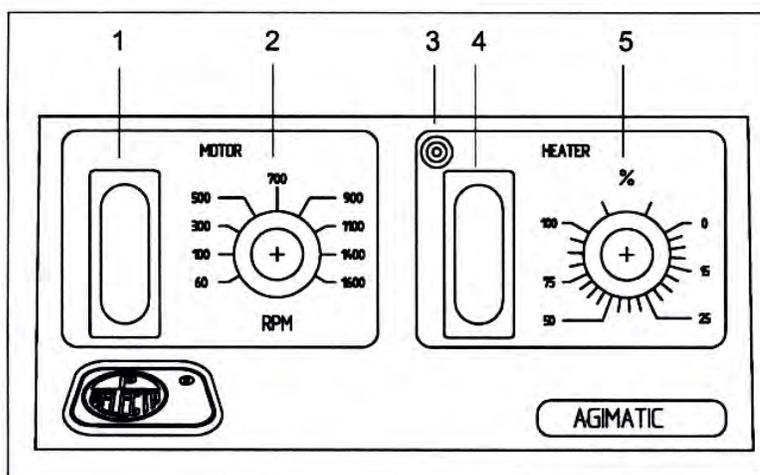
ESPECIFICACIONES

- a. Voltaje 115 –230 v 50/60 Hz según se indique en la placa de características de la maquina
- b. Consumo: 625 w
- c. Temperatura máxima : 350⁰C
- d. Rango de regulación (ELECTEMP): ambiente + 50 ⁰C /350 ⁰C
- e. Resolución (ELECTEMP) hasta 100 ⁰C: 0.1 ⁰C
- f. Resolución (ELECTEMP) a partir de 100⁰C: 1 ⁰C
- g. Velocidad de 60 hasta 1600 rpm.
- h. Potencia de agitación : 10.000 mL
- i. Peso 3.8 Kg
- j. Limitador de temperatura: 350 / 370 ⁰C

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DEL AGITADOR MAGNETICO ELECTRICO AGIMATIC –N	Código: ALI –01 –IE. 11
		Página 2 de 5
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

PARTES DEL EQUIPO

1. Interruptor general / motor
2. Mando ajuste velocidad RPM
3. Piloto indicador calefacción (ámbar)
4. Interruptor calefacción (HEATER)
5. Mando de ajuste potencia calefactora



	INSTRUCCIONES DE MANEJO DEL AGITADOR MAGNETICO ELECTRICO AGIMATIC –N	Código: ALI –01 –IE. 11
		Página 3 de 5
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

III. PROCEDIMIENTO

1. Colocar el AGIMATIC en una superficie plana y nivelada cerca de un toma corriente.
2. Conectar el cable de conexión a la base de la parte posterior del AGIMATIC y la clavija de la red eléctrica
3. Poner el recipiente objeto de la agitación sobre el plato del agitador, y dejar caer el imán teflonado en el interior del recipiente
4. Accionar el interruptor de puesta en marcha “motor” (1)
5. Ajustar la velocidad mediante el botón RPM (2)
6. Accionar el interruptor de la calefacción “HEATER” y ajustar al tanto por ciento de energía calorífica mediante el botón %
7. Para detenerlo, se regresa a 0 %, se acciona el interruptor de la calefacción y el interruptor motor.

IV. LIMPIEZA Y MANTENIMIENTO

- Para la limpieza de las diferentes piezas del aparato se recomienda:
Limpieza del acero inoxidable: alcohol
- Limpieza de carátulas y plásticos: alcohol con algodón o con un paño no abrasivo.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DEL AGITADOR MAGNETICO ELECTRICO AGIMATIC –N	Código: ALI –01 –IE. 11
		Página 4 de 5
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

V. TERMINOS Y DEFINICIONES

- Agitador: Instrumento o aparato que sirve para revolver líquidos. ⁽¹⁰⁾

VI. BIBLIOGRAFIA Y/O DOCUMENTOS DE REFERENCIA

Manual de Instrucciones de Agitadores Magnéticos electrónicos y sin calefacción. JP Selecta s.a., España. ⁽²⁰⁾

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL MICROSCOPIO ECLIPSE E400 NIKON	Código: ALI -01 -IE. 12
		Página 1 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

I. INTRODUCCION

Es un instrumento utilizado para observar la morfología microscópica de microorganismos con la ayuda de técnicas de coloración como la tinción al Gram.

II. ESPECIFICACIONES Y PARTES DEL EQUIPO

PARTES COMPONENTES Y PARTES OPERACIONALES

1. Sostenedor de la Muestra.
2. Tornillo sujetador del Condensador.
3. Perilla del foco Condensador.
4. Aro rotatorio ajustador grueso (fuerza giratoria).
5. Tornillo del foco grueso.
6. Tornillo del foco fino.
7. Ajustador de la luz (lámpara)
8. Swith del autofoto.
9. Tubo del ocular.
10. Ocular.
11. Aro ajustador "Diopter".
12. Elevador del nivel del ojo.
13. Revólver.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL MICROSCOPIO ECLIPSE E400 NIKON	Código: ALI –01 –IE. 12
		Página 2 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

14. Objetivos.

15. Platina.

16. Tornillo central del Condensador

17. Aro del campo del diagrama.

18. Campo del lente.

19. Tornillo sujetador del tubo ocular.

20. Tornillo sujetador del elevador del nivel del ojo.

21. Aro de detección del foco grueso (sujetador).

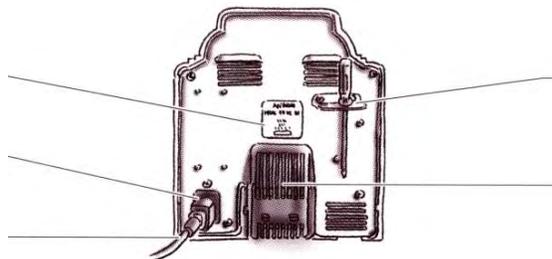
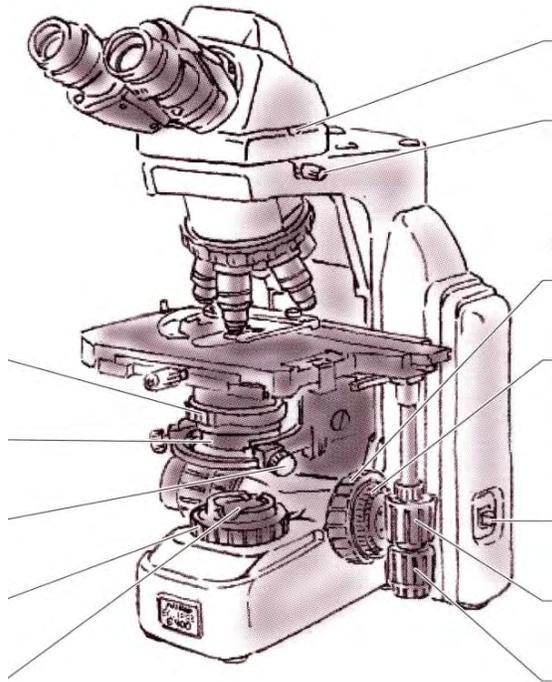
22. Perilla del foco fino.

23. Swith de encendido.

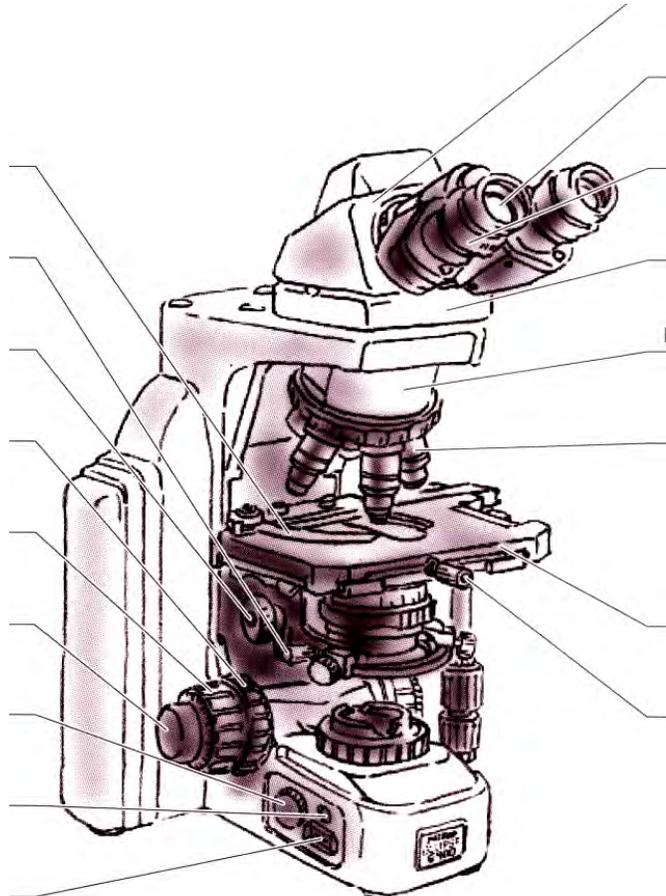
24. Perilla de control del movimiento eje “Y” de la platina.

25. Perilla de control del movimiento eje “X” de la platina.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL MICROSCOPIO ECLIPSE E400 NIKON		Código: ALI -01 -IE. 12
			Página 3 de 17
			Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:	



	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL MICROSCOPIO ECLIPSE E400 NIKON	Código: ALI -01 -IE. 12
		Página 4 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:



III. PROCEDIMIENTO

A PREPARACION DEL MICROSCOPIO

1. Activar el swith de encendido y el de la luz.
2. Transferir el filtro NCB11 sobre el campo del lente y ajustar la claridad apropiada.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL MICROSCOPIO ECLIPSE E400 NIKON	Código: ALI –01 –IE. 12
		Página 5 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

3. Ajustadores de la distancia interpupilar y diopter, son diseñados para ajustar el microscopio a la persona que lo esta usando; efectuar el ajuste Diopter para ambos oculares respectivamente. (Asegúrese de ajustar apropiadamente el microscopio cada vez que se use).
 - 3.1. Encender el aro ajustador diopter sobre el ocular para alinear el final del aro ajustador diopter con la línea (Esta en la posición “0” del ajustador diopter).
 - 3.2. Encender el botón del foco grueso y foco fino sobre la muestra con el objetivo 40x (cuando es dificultoso enfocar la muestra primero usando el objetivo 4x o el 10x y luego con el 40x).
 - 3.3. Mover el objetivo 4x o 10x en la trayectoria óptica. Encender el aro regulador del ajuste del diopter en el ocular, no el botón del foco grueso y fino sobre la muestra, proceder así, cuando se este observando con el ojo derecho a través del ocular derecho y con el ojo izquierdo a través del ocular izquierdo.
 - 3.4. Ajustar la extensión de la parte binocular a la distancia entre sus ojos de manera que el campo de visión de cada ojo este alineado en una posición cuando se esta observando con ambos ojos.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL MICROSCOPIO ECLIPSE E400 NIKON	Código: ALI –01 –IE. 12
		Página 6 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

B TRANSFERENCIA DE LA MUESTRA

1. Transferir el portaobjeto conteniendo la muestra sobre la platina con el cubre objeto por encima y sujetar con el sostenedor de la muestra.
2. Ajustar la iluminación, el color de la luz cambia al mismo tiempo que cambia el ajuste. Si el ajuste es reducido al voltaje mas bajo, el tono de color de la luz de la lámpara se vuelve rojizo. Si el voltaje es incrementado, el color se vuelve azulado.
3. Para mantener el tono del color constante, ajustar la brillantez colocando filtros ND sobre el filtro NCB11.

C CAMBIO DE LA MAGNIFICACION

1. Ajuste de la apertura del condensador diafragma.
 - 1.1 Ajustar el diafragma de acuerdo a la apertura numérica del objetivo.
 - 1.2 Girando los aros de apertura del condensador diafragma se cambia el tamaño de la apertura del diafragma. (cuando la apertura del diafragma se detiene, la luminosidad se reduce y el detalle de la muestra se vuelve mas difícil de ver, mientras que el contraste y la profundidad del foco aumentan, al contrario, cuando la apertura del diafragma es abierta, la luminosidad aumenta y el detalle se vuelve más fácil de ver,

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL MICROSCOPIO ECLIPSE E400 NIKON	Código: ALI –01 –IE. 12
		Página 7 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

mientras que el contraste y la profundidad del foco se reducen, no es posible ajustar uno sin afectar al otro.)

- 1.3. Una indicación de 40x/0.75 significa que la magnificación es 40x y la apertura numérica es 0.75
2. Ajuste del tamaño de apertura del diafragma de acuerdo a la escala del condensador.
 - 2.1 Ajustar el aro de apertura del diafragma de acuerdo a la escala.
3. Ajuste del tamaño de apertura del diafragma usando un telescopio centrado.
 - 3.1 Quitar uno de los oculares y usando un adaptador especial (sold separately) montar un telescopio centrado en su lugar.
 - 3.2 Girar el aro de apertura del diafragma hasta que se detenga tanto como sea posible.
 - 3.3 Mientras sostiene la pestaña del telescopio gire el ocular del telescopio al foco en la apertura del diafragma
 - 3.4 Gire el anillo de apertura del diafragma para ajustar el tamaño de apertura del diafragma.
 - 3.5. Quite el telescopio centrado y el adaptador, reinstale el ocular.
4. Ajuste del campo del diafragma.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL MICROSCOPIO ECLIPSE E400 NIKON	Código: ALI –01 –IE. 12
		Página 8 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

- 4.1. El campo del diafragma limita la iluminación hacia el área de la muestra que esta siendo observada, se cambia el tamaño del campo del diafragma moviendo el aro de campo del diafragma.
- 4.2. Para observación normal, el tamaño del diafragma debe ajustarse afuera del borde del campo de visión. Este ajuste puede producir la imagen con apropiado contraste.

D FOTOMICROGRAFIA

1. Selección de un tubo del ocular.
 - 1.1 Seleccionar tubo de acuerdo al propósito del uso, (existen dos tubos oculares trinoculares)
 - 1.2. Operando la palanca de selección de la trayectoria óptica se cambia la cantidad de luz que entra en la parte binocular y en el tubo vertical del tubo ocular.
2. Adaptador del tubo vertical.
 - 2.1. Un adaptador de foto del tubo vertical se proporciona en el tubo del ocular trinocular como un equipo estándar, (permite que se instale un equipo de fotomicrografía).

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL MICROSCOPIO ECLIPSE E400 NIKON	Código: ALI –01 –IE. 12
		Página 9 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

2.2. Para instalar el adaptador de foto del tubo vertical, se debe insertar en el tubo vertical y apretar tres tornillos de la abrazadera en el tubo vertical usando un desatornillador hexadiagonal proporcionado.

2.3. Sustituir el adaptador de foto del tubo con un adaptador de tubo vertical de televisión en el caso de usar una cámara de televisión.

3. Selección del tono de color y brillantez

3.1. El tono de color de la lámpara varía de acuerdo al voltaje, por lo tanto, para mantener la mejor reproducción del color en fotomicrografía, el voltaje de la lámpara debe mantenerse constante.

3.2 El interruptor autofoto se usa para colocar automáticamente el voltaje estándar de la lámpara, (La posición central del interruptor del nivel 5 es la posición estándar.)

3.3. Deslizándolo hacia delante el interruptor se aumenta el tinte azulado de la luz, mientras que deslizándolo el interruptor hacia atrás aumenta el tinte rojizo de la luz.

E BUSQUEDA DE LA POSICION DEL ENFOQUE

1. Tapón del foco grueso

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL MICROSCOPIO ECLIPSE E400 NIKON	Código: ALI –01 –IE. 12
		Página 10 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Una vez que el botón del foco quede en su puesto, el tornillo del foco grueso no debe usarse para mover la platina más alto, (el movimiento de la platina por el tornillo del foco fino no es restringido)

- 1.1. Una vez que el tornillo del foco grueso esta en el lugar dentro de la posición del foco, un enfoque tosco puede lograrse en la siguiente vez por simple giro del tornillo del foco grueso tan lejos como pueda.
- 1.2. Esta propiedad es conveniente cuando se están observando especies una después de la otra.
2. Usando el tapón del foco grueso
 - 2.1. Con la muestra enfocada, girar el aro del botón del foco grueso aproximadamente 270° en la dirección de la flecha indicada en la base del microscopio (en dirección de las agujas del reloj), para apretar el aro. El tapón del foco grueso esta ahora en su lugar.
 - 2.2. Cuando se cambia la muestra, se baja la platina girando solo el tornillo del foco grueso.
 - 2.3. Después de cambiar la muestra, levemente levante la platina girando solo el tornillo del foco grueso tanto como pueda, (la muestra debe estar toscamente enfocada cuando la platina ha subido lo más posible.)

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL MICROSCOPIO ECLIPSE E400 NIKON	Código: ALI –01 –IE. 12
		Página 11 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

2.4. Use el tornillo del foco fino para darle a la muestra un enfoque perfecto.

2.5. Si el tapón del foco grueso no esta siendo usado, asegúrese de aflojar el aro tanto como pueda, girándolo en dirección opuesta a la flecha indicada en la base del microscopio.

F CAMBIANDO LA FUERZA DE TORSION DEL TORNILLO DEL FOCO GRUESO.

1. La fuerza de torsión del tornillo puede ajustarse, para incrementar esa fuerza, gire el aro de ajuste de la fuerza de torsión (TORQUE) localizado detrás del tornillo del foco grueso en la dirección de la flecha indicada en la base del microscopio, (en dirección de las agujas del reloj.)

2. Para reducir la fuerza de torsión, gire el aro en dirección opuesta a la flecha (en dirección de las agujas del reloj.)

Nunca intente ninguna de las siguientes acciones, estas dañaran el microscopio.

- Girar los tornillos izquierdo y derecho en dirección opuesta al mismo tiempo.
- Continuar rotando el tornillo del foco grueso después que la platina ha alcanzado el limite de su movimiento.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL MICROSCOPIO ECLIPSE E400 NIKON	Código: ALI -01 -IE. 12
		Página 12 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

G CAMBIANDO LA FUERZA DE TORSION DEL BOTON DE CONTROL DEL MOVIMIENTO DE LA PLATINA

El botón del control de la fuerza de torsión en el eje de las X y de las Y del movimiento de la platina, puede ser ajustado, es fácil ajustar si la platina se mueve al límite del movimiento.

1. Ajuste de la fuerza de torsión del movimiento en el eje de las Y de la platina.

1.1. Gire el botón B en dirección de la flecha  mientras sostiene el botón A; para reducir la tensión, gire el botón B en dirección opuesta.

2. Ajuste de la fuerza de torsión del movimiento en el eje de las X de la platina.

2.1. Gire el botón C en dirección de la flecha "b"  mientras sostiene el botón C en dirección opuesta. Inserte su dedo dentro del orificio del botón D para sostenerlo.

H OPERACIÓN DE ACEITE DE INMERSION

(Usando objetivo y condensador tipo aceite de inmersión)

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL MICROSCOPIO ECLIPSE E400 NIKON	Código: ALI –01 –IE. 12
		Página 13 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

1. Los objetivos marcados “aceite” (“oil”), son objetivos tipo aceite de inmersión, el cual se aplica entre la muestra y la superficie del objetivo.
2. Para lograr el máximo funcionamiento del objetivo de inmersión con apertura numérica de 1.0 o mayor, puede usarse un condensador acromático aplanat de aceite de inmersión. (Burbujas en el aceite pueden ocasionar efectos adversos en el enfoque de la imagen.)
3. Para revisar burbujas de aire, quite los oculares, abra el campo del diafragma y la apertura del diafragma lo mas lejos que pueda, y observe la salida de la pupila del objetivo dentro del tubo del ocular. Si hay burbujas, remuévalas usando uno de los siguientes métodos:
 - a.) Gire la nosepiece del revólver suavemente para mover el objetivo de inmersión para atrás y adelante una o dos veces.
Añada mas aceite.
Quite el aceite y reemplácelo con aceite nuevo.
 - b.) Use poco aceite, limpie el objetivo y el condensador después de su uso.
 - c.) Use benceno de petróleo para quitar el aceite y terminar la limpieza con alcohol absoluto, Si no se tiene benceno de petróleo use alcohol metílico.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL MICROSCOPIO ECLIPSE E400 NIKON	Código: ALI –01 –IE. 12
		Página 14 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

I OPERACIÓN DE AGUA DE INMERSION

1. Los objetivos marcados con “W1” o “W” son los de agua de inmersión, se usan con agua destilada o solución salina fisiológica, aplicada entre la muestra y el objetivo
2. Puesto que el agua se evapora fácilmente, se debe chequear periódicamente durante la observación. (Al aplicar un exceso podría provocar corrosión en la platina y condensador.)
3. Después del uso, limpie el agua y termine la limpieza con alcohol absoluto.
4. Si queda una mancha, aplique una pequeña cantidad de detergente neutro y limpie con un paño suavemente.

IV. LIMPIEZA Y MANTENIMIENTO

a. LIMPIEZA DE LOS LENTES:

- Cepille el polvo con una brocha suave o límpielo con una gasa.
- Para quitar las huellas de los dedos o la grasa del lente, humedezca una pieza de tela de algodón limpia o gasa con alcohol absoluto (alcohol etílico o metílico) y límpielo.
- No limpie la entrada de los lentes en el tubo con benceno de petróleo.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL MICROSCOPIO ECLIPSE E400 NIKON	Código: ALI –01 –IE. 12
		Página 15 de 17
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

b. MANTENIMIENTO DEL MICROSCOPIO LIMPIO

- No use solventes orgánicos, tales como alcohol, éter, en componentes de pintura, componentes de plástico.
- Cuando el microscopio este excesivamente sucio, remójelo con una pequeña cantidad de detergente neutral diluido en una gasa o paño.

c. ALMACENAMIENTO

- Guarde el microscopio en un lugar con baja humedad y no lo exponga a altas temperaturas. Al almacenarlo en un lugar húmedo puede causar hongos en los lentes.
- Guarde los objetivos y oculares en un desecador o contenedor similar con agente desecante.
- Coloque la cubierta de vinilo sobre el microscopio para proteger del polvo.
- Antes de colocar la cubierta de vinilo, apague el microscopio y espere a que enfríe la lámpara.

V. TERMINOS Y DEFINICIONES:

- Microscopio: Cualquiera de las distintos tipos de instrumentos, que se utilizan para obtener una imagen aumentada de objetos minúsculos o detalles muy pequeños de los mismos^(11.)

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL MICROSCOPIO ECLIPSE E400 NIKON		Código: ALI -01 -IE. 12
			Página 16 de 17
			Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:	

- Lente: Cristal refractante de superficie esférica con caras cóncavas o convexas.

VI. BIBLIOGRAFIA Y/O DOCUMENTACION DE REFERENCIA:

Instrucciones de Microscopio Eclipse E400 NIKON.2000 ⁽²⁴⁾

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL CIRCULADOR STOMACHER 400	Código: ALI –01 –IE. 13
		Página 1 de 14
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

I. INTRODUCCION

El sewar stomacher es un instrumento único para la homogenización en la cual la muestra es efectivamente mezclada dentro de la bolsa especialmente disponible. El instrumento actúa sobre la bolsa en una acción de manera similar al del estomago de ahí el nombre de stomacher.

II. ESPECIFICACIONES Y PARTES DEL EQUIPO

A.) FUNCIONES DE INTERRUPTORES DE OPERACION

1. Interruptor de velocidad/tiempo:

Activa el icono enunciador exhibido entre los escaparates de velocidad/ tiempo.

2. Tecla más (+):

Aumenta el valor del parámetro enunciado i.e. velocidad/tiempo.

3. Tecla menos (-):

Disminuye el valor del parámetro enunciado i.e velocidad/tiempo.

4. Interruptor auto:

Activa el instrumento entre las formas de operación manual y automático.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL CIRCULADOR STOMACHER 400	Código: ALI -01 -IE. 13
		Página 2 de 14
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

5. Interruptor de programa:

Activa a través de la selección de programa almacenado, P1, P2, P3 y no programado.

6. Interruptor de inicio:

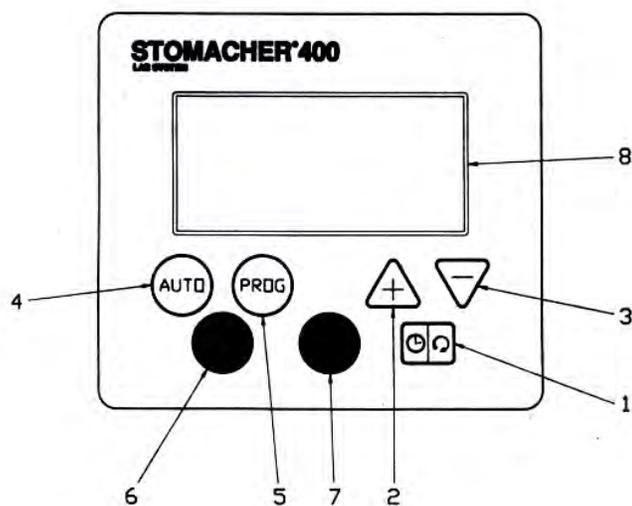
Inicia el instrumento en estilo manual e inicialmente en auto.

7. Interruptor de alto:

Detiene el instrumento en su estilo operacional.

8. Exhibidor liquido cristal:

Muestra los valores de la función seleccionada y el estado de los iconos.



	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL CIRCULADOR STOMACHER 400	Código: ALI –01 –IE. 13
		Página 3 de 14
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

B. FUNCIONES DE LOS ICONOS DE PANTALLA

1. Icono enunciador:

Continuamente indica cual parámetro tiene el foco i.e velocidad/tiempo.

2. Icono de condición de pérdida de velocidad:

Mostrado únicamente cuando la condición de perdida de velocidad de un motor a ocurrido.

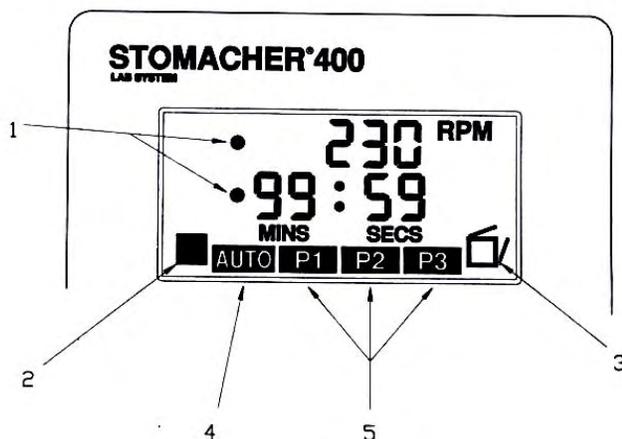
3. Icono de puerta abierta:

Mostrado solo cuando la puerta esta abierta.

4. Icono auto:

Mostrado solo cuando el estilo de operación automática es seleccionada, no hay icono mostrado para el estilo manual.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL CIRCULADOR STOMACHER 400	Código: ALI -01 -IE. 13
		Página 4 de 14
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:



C. SELECCION DE BOLSA Y LLENADO:

Para mejores resultados es recomendado que solo sean usadas las bolsas genuinas de seward stomacher.

Los alimentos refrigerados profundamente no deberían dañar las bolsas, pero partículas duras como huesos gramillas, pepitas de frutas y semillas pueden perforar la bolsa. Donde las condiciones marginales existan o materiales peligrosos estén siendo mezclados es recomendado que sean utilizadas dos bolsas, una dentro de la otra.

La muestra y diluyente (e.g. 10g. + 90mL de diluyente) son colocados en la bolsa seleccionada, proveyendo el volumen total que está entre la capacidad

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL CIRCULADOR STOMACHER 400	Código: ALI –01 –IE. 13
		Página 5 de 14
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

recomendada del instrumento, cantidad de muestra/diluyente pueden ser variadas de acuerdo a la preferencia.

Si se requieren varias bolsas puede ser procesada simultáneamente proveyendo el volumen total que no exceda de 400mL.

D. SELECCIÓN DE VELOCIDAD:

Existen tres pre-series de velocidades establecidas, 200, 230 y 260rpm estas directamente equivalen a baja, normal y alto, como modelos previos, la de 230 es considerada apropiada para la mayoría de aplicaciones.

E. TIEMPO DE SELECCIÓN:

Muestras para análisis bacteriológico típicamente requiere 30 seg. Aunque productos altos en grasa tales como pastel y algunos otros tales como trigo requieren un periodo mas largo de tiempo, materia de alimentos congelados toman más tiempo que los descongelados.

Tiempos de mezclados sugeridos:

La mayoría de sustancias	30 seg.
Alimentos grasos, crema, pastel	60 seg.
Tabaco	300 seg.
Extracción de lípidos de alimentos	120 seg.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL CIRCULADOR STOMACHER 400	Código: ALI –01 –IE. 13
		Página 6 de 14
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

Extracción de toxinas	60 seg.
Mezclado en polvo	15 seg.
Pulpa de fruta	60 seg.

F. AJUSTE DE PALETAS:

1. Para ajustar la paleta despejar el enchufe fuera y desconectar el instrumento del proveedor principal.
2. Girar el instrumento sobre el soporte apropiado para prevenir daño.
3. Remover la cubierta trasera y aflojar los tornillos del casquete del enchufe hembra sosteniendo la lamina ascendente del motor al cuerpo principal.
4. No aflojar los tornillos que sostiene la caja de cambios de motor a la lámina ascendente del motor o el alineamiento del motor será destruido.
5. Girar el tornillo ajustado hasta que cada paleta solo toque la cara por dentro de la puerta cuando ellos estén en su máxima posición de golpe hacia delante, (Esto puede ser hecho manualmente rotando el eje de producción de energía de la caja de cambios).

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL CIRCULADOR STOMACHER 400	Código: ALI –01 –IE. 13
		Página 7 de 14
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

6. Tomar cualquier contragolpe en el tornillo de ajuste y girar el tornillo hacia atrás uno a uno y girar la cuarta parte, (este es el ajuste mínimo de despeje).
7. Para un despeje mas grande de la paleta, cada giro adicional hacia atrás de ajuste de los tornillos aumenta el despeje desde 1.5 mm hasta un máximo de 10 mm.
8. Cuando el ajuste es completo siempre reapretar los tornillos del casquete del enchufe hembra y volviendo a colocar la cubierta trasera.

III. PROCEDIMIENTO

A.) OPERACIÓN MANUAL

1. Asegúrese que el enchufe baloncín “On/Off” este en posición “On”. La luz verde en el enchufe estará iluminada indicando que la
2. energía esta presente, el instrumento debería también emitir un corto sonido, la pantalla debería ahora indicar el estado del instrumento.
3. Asegúrese que el icono de auto no este presente presione la tecla auto para revertir el estilo manual si es necesario y no estén los programas P1, P2, P3 seleccionados.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL CIRCULADOR STOMACHER 400	Código: ALI –01 –IE. 13
		Página 8 de 14
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

4. Abrir la puerta levantando la tapa completamente hacia arriba y hacia atrás, esto da acceso al compartimiento de la paleta. El icono de puerta abierta no estará mostrado en la pantalla.
5. Colocar la bolsa del stomacher cargada hacia el compartimiento de la paleta dejando 50 a 60 mm. Sobresaliendo sobre la abrazadera de la bolsa y cerrar la puerta así apretando las bolsas. El icono de puerta abierta desaparecerá ahora.
6. El icono enunciador indica que tiempo tiene el ajuste, (muestra incumplimiento de 30 seg.). El tiempo establecido puede ajustarse presionando la tecla más o menos como sea necesario. El ajuste es variable entre 0 seg. Y 99mm. 59 seg. En aumento de 1 seg. Presionando y soltando el interruptor más o menos aumenta el tiempo de 1 seg.
7. Presionando el interruptor velocidad/tiempo se activa el icono enunciador para indicar que la velocidad tiene el ajuste, (muestra un incumplimiento de 230rpm.) El establecimiento de velocidad puede ahora ser ajustado presionando la tecla más o menos como sea requerido. Los ajustes disponibles son 200rpm (bajo), 230rpm (normal) y 260rpm (alto).

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL CIRCULADOR STOMACHER 400	Código: ALI –01 –IE. 13
		Página 9 de 14
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

8. Presionando el interruptor de inicio se iniciará el proceso de mezclado. El interruptor funcionará en velocidad seleccionada por la duración seleccionada. El tiempo mostrado cuenta desde el tiempo seleccionado y el tiempo mostrado durante el proceso, el proceso de mezclado continúa en circunstancias normales hasta que:
- El ciclo de tiempo ha finalizado
 - Se presione la tecla detener
 - La puerta ha sido abierta
 - La energía ha sido desenchufada
9. Después del proceso, simplemente abrir la puerta y sacar la bolsa del stomacher. El instrumento esta listo para procesar la próxima muestra(s).

B.) OPERACIÓN AUTOMÁTICA

1. Seleccionar los valores de Velocidad/tiempo como se describió previamente en (A).
2. Presionar el interruptor auto, el icono auto debería ser ahora presentado en la pantalla.
3. Llenar la bolsa(s) del stomacher cargada como se describió en (A).

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL CIRCULADOR STOMACHER 400	Código: ALI –01 –IE. 13
		Página 10 de 14
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

4. Cerrando la puerta iniciará el proceso de mezclado. El instrumento funcionará en la velocidad seleccionada por la duración seleccionada, el tiempo mostrado en pantalla cuenta desde la selección del tiempo y el tiempo mostrado durante el proceso. El proceso de mezclado continua en condiciones normales hasta que:
- El ciclo de tiempo ha finalizado.
 - El interruptor de parar es presionado.
 - La puerta ha sido abierta.
 - La energía ha sido desenchufada.
5. Cuando el proceso es completado simplemente abrir la puerta, sacar la muestra procesada y colocar la próxima muestra hacia el instrumento, cerrar la puerta y el proceso comenzará automáticamente.

C.) PROGRAMA DE ARCHIVO DE ELABORACION:

Para guardar o cambiar un programa:

1. Presionando y soltando el interruptor de programa se activa a través de la selección de tres programa indicados por los iconos P1, P2 y P3

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL CIRCULADOR STOMACHER 400	Código: ALI –01 –IE. 13
		Página 11 de 14
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

2. y retornar al manual (no al icono de programa). Presionar y soltar el interruptor en el número de programa deseado.
3. Ajustar los valores de velocidad/tiempo como se describió previamente en (A).
4. Simultáneamente presionar y sostener abajo la tecla auto y el interruptor de programa por al menos 2 seg. Esto es reconocida por un sonido más largo (500ms.) Los valores mostrados de velocidad/tiempo han sido almacenados en la memoria.

A. USANDO PROGRAMAS DE ELABORACION ALMACENADOS

a) EN MODO MANUAL

2. Presionar y soltar el interruptor de programa para seleccionar el interruptor deseado, ya sea el icono P1, P2 o P3, debería mostrarse ahora en pantalla.
3. Llenar la bolsa del stomacher cargado como se describió previamente.
4. Presionar la tecla de icono lo cual iniciará el proceso de mezclado como se describió previamente.
5. Después de la elaboración, simplemente abrir la puerta y retirar la bolsa del stomacher, el instrumento esta listo para la elaboración de la próxima muestra(s).

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL CIRCULADOR STOMACHER 400	Código: ALI –01 –IE. 13
		Página 12 de 14
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

b) EN MODO AUTO

1. Presionar y soltar la tecla programa para seleccionar la tecla deseada, entonces el icono P1, P2 o P3, debería estar presente en la pantalla.
2. Presionar la tecla auto, el icono auto debería ahora estar presente en pantalla.
3. Llenar la bolsa del stomacher cargado como se describió previamente.
4. Cerrando la puerta iniciará el proceso de mezclado como se describió previamente.
5. Cuando el proceso es completado simplemente abrir la puerta, retirar la muestra procesada y colocar la próxima muestra hacia el instrumento. Cerrar la puerta y la elaboración comenzará automáticamente.

IV. LIMPIEZA Y MANTENIMIENTO

- El aparato deberá ser mantenido experimentalmente limpio sacudiéndolo periódicamente con una tela humedecida con detergente líquido suave.

	INSTRUCCIONES DE MANEJO Y USO DEL CIRCULADOR STOMACHER 400	Código: ALI –01 –IE. 13
		Página 13 de 14
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

V. TERMINOS Y DEFINICIONES:

- Mezcla: Agregación de varias sustancias o cuerpos que no tienen entre si acción química.⁽¹³⁾

VI. BIBLIOGRAFIA Y/O DOCUMENTACION DE REFERENCIA:

Instruccions operating Stomacher 400 Circulator, Seqrrd, July 98 E-mail:
info@seward.co.uk/www.seward.co.uk.⁽²⁷⁾

CAPITULO IX
INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

9. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la entrevista efectuada a los laboratorios acreditados, se pudo verificar la forma en que han trabajado y el esfuerzo aplicado para obtener la acreditación, ya que los cuatro laboratorios coinciden en algunas de las respuestas obtenidos, que son las siguientes:

- Las ventajas que les ofrece la acreditación como mayor orden y mayor confiabilidad de resultados.
- Ofrecen sus servicios de análisis a todo tipo de instituciones o clientes.
- Los cuatro laboratorios tienen su equipo completo y un manual de instrucciones para su uso.
- Le realizan análisis a todo tipo de alimentos.
- Utilizan metodología analítica oficial.
- Poseen cepario.
- Los datos los registran de manera segura.
- Llevan un control de vida útil de los reactivos y medios de cultivo.
- Las instalaciones cumplen con los requisitos que exige la acreditación como una bodega de reactivos y separación e identificación de áreas.

Como se puede observar, coinciden en más del 50% de las respuestas, lo que permite demostrar que los laboratorios acreditados poseen óptimas condiciones de trabajo y de esmero continuo para mantener el

reconocimiento por lo que los resultados en los análisis se vuelven más confiables.

Con respecto a los procedimientos normalizados de análisis, se puede ver que el hecho de incluir en ellos partes que recomienda la norma ISO / IEC 17025 los transforma en manuales más completos que garantizan la obtención de resultados de análisis eficientes, por lo tanto, el contar con procedimientos normalizados que estén validados que cumplan con la norma es un paso indispensable para optar por la acreditación.

Las instrucciones de manejo de cada uno de los equipos contemplados en este trabajo se realizaron de forma sencilla y clara para ser utilizadas y entendidas por el personal responsable de su uso, así también para darle el mantenimiento adecuado y funcionamiento eficiente.

CAPITULO X
CONCLUSIONES

10. CONCLUSIONES

1. En todo laboratorio de análisis microbiológico de alimentos es indispensable la existencia de un manual que contenga las técnicas de análisis a ser utilizadas para el cumplimiento de sus respectivas funciones.
2. Para elaborar un manual de procedimientos normalizados se puede hacer uso de métodos oficiales o no oficiales, los cuales el laboratorio deberá validar como se especifica hasta adaptarse a sus condiciones de trabajo y obtener resultados precisos.
3. El laboratorio que cumpla con los lineamientos y requerimientos que recomienda el ente acreditador y que ha logrado validar sus procedimientos puede optar por la acreditación.
4. El laboratorio de Calidad de Alimentos y Aguas del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS) y los laboratorios Especializados en Control de Calidad (LECC) les llevó menos tiempo acreditarse, ya que cumplían previamente con parte de los requisitos que exige la norma ISO / IEC 17025
5. El laboratorio de Calidad Integral de la Fundación Salvadoreña para el Desarrollo Social (FUSADES) y el laboratorio de Especialidades Microbiológicas Industriales (ESMI) realizan el mayor número de análisis microbiológicos acreditados debido a que su trabajo se enfoca más al área microbiológica que a la físico química.
6. Los cuatro laboratorios dedicados al análisis de alimentos que se encuentran acreditados han obtenido una serie de ventajas como mejor

organización, mayor orden, optimización de recursos y rapidez entre otras, obteniendo de esta manera resultados más confiables.

7. Los cuatro laboratorios acreditados están aptos para efectuar análisis microbiológicos a todo tipo de muestras de alimentos de cualquier institución que lo solicite.
8. El personal que labora en un laboratorio acreditado debe conocer los requisitos que exige la norma ISO / IEC 17025 respecto a la elaboración de documentos como manuales de procedimientos, manuales de seguridad, etc.
9. Una vez obtenida la acreditación se vuelve un compromiso para el laboratorio, pues no solo se trata de conseguirla sino de comprometerse a su cumplimiento.
10. En el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) no se cuenta con instrucciones del manejo de equipo, por lo tanto las instrucciones proporcionadas en este trabajo le servirán de apoyo para el adecuado funcionamiento del mismo.
11. Los aspectos más importantes a considerar para acreditar un Laboratorio son: documentación, Procedimientos, Registros, Instalaciones y Personal.

CAPITULO XI
RECOMENDACIONES

11. RECOMENDACIONES

- 1- Que el organismo encargado de otorgar la acreditación, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, motive a acreditar los procedimientos de análisis a los laboratorios que no están acreditados.
- 2- Que exista una mayor divulgación a nivel educativo por parte de las respectivas autoridades, sobre lo que es la acreditación, principalmente a estudiantes relacionados con áreas de la salud e industria alimentaria.
- 3- A los laboratorios acreditados, que traten de obtener la acreditación de todos sus procedimientos de análisis y que día a día actualicen su documentación y metodología de análisis, ya que constantemente hay variación en ellas por la innovación en el equipo, medios de cultivo y reactivos, así como una capacitación continua para el personal en cada una de las áreas.
- 4- Que exista apoyo entre los laboratorios que han acreditado sus procedimientos de análisis, ya que eso significa que operan bajo las mismas condiciones de calidad.
- 5- Que los métodos de análisis a ser incluidos en un manual sean antes validados, tomando en consideración las características de funcionamiento

típico de los métodos de análisis como son: aplicabilidad, selectividad, calibración, veracidad, precisión, recuperación, intervalo operativo, límite de cuantificación, límite de detección, sensibilidad, robustez e incertidumbre de la medición.

- 6- Que los procedimientos de análisis normalizados sean utilizados adecuadamente por parte del personal técnico respetando cada paso a seguir de la metodología analítica.

- 7- Que los laboratorios renovando el certificado de acreditación de análisis de alimentos posean un documento que contenga las instrucciones de manejo del equipo con el fin de mantenerlo en óptimas condiciones de funcionamiento y mantenimiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos. Marzo, 1997.
Manual para la certificación de Laboratorios de Análisis de agua potable.
Criterios y Procedimientos para el aseguramiento de la calidad 4a ed.
Estados Unidos
2. Bunsen. 1999. Manual de Instrucciones de operación Baño Termostático
Pág. 18, 22-25, 41-46
3. Cobos. 1998 Manual de Instrucciones de operación. Balanza electrónica.
Barcelona. E. Pág. 1,5, 6, 11, 12,15.
4. Comecta 2000. Manual de Instrucciones de operación Contador de Colonias
Barcelona E.
5. CONACYT. (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología E.S), 1995.
Reglamento de Acreditación de Laboratorio de Ensayos y Análisis. San
Salvador. El Salvador. Pág.3-10
6. CONACYT. (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología E.S), 1999,
Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Prueba y
Calibración (NSR 03.00.07:00), Primera edición, San Salvador El Salvador
ISO/IEC 17025. Pág. 4-15, 17-23, 33.
7. CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología E.S), (en línea) El
Salvador. www.conacyt.gob.sv

8. Electrolux. 2000. Manual de Instrucciones de operación. Congelador ultra frío. Alemania.
9. En línea documento disponible en línea a través de los servicios de Internet.
www.cdc.gov.
10. En línea documento disponible en línea a través de los servicios de Internet.
www.fundacionchile.cl
11. En línea documento disponible en línea a través de los servicios de Internet.
www.microbiologia.com.ac
12. En línea documento disponible en línea a través de los servicios de Internet.
www.monografias.com
13. En línea documento disponible en línea a través de los servicios de Internet.
www.motor.terra.es
14. En línea documento disponible en línea a través de los servicios de Internet.
www.paho.org//spanish/manuals
15. FDA. 2001. Manual de Análisis Bacteriológico (en línea) Estados Unidos.
<http://www.cfsan.fda.gov/>
16. Frazier W.C. y Otros. 1993. Microbiología de los Alimentos. 4a ed. España Zaragoza. Editorial Acribia. Pág. 3-4,24,28 -30,41-44, 570
17. Guzmán Julián OD. Y Otros, 2000, Propuesta de un manual de un sistema de acreditación para un laboratorio de evaluación Microbiológico de producto farmacéuticos, Trabajo de Graduación para Optar al Título de Lic.

en Química y Farmacia, San Salvador, El Salvador, Universidad de El Salvador. Pág. 7-8, 30-35.

18. Heidolph. 1999. Manual de Instrucciones de operación Agitador electrónico. Alemania
19. Jawetz E. Y Otros. 1992. Microbiología Medica .14a ed. México. Manual Moderno. Pág. 31,205,207,213,231-235,237-238.
20. JP. Selecta. 1999. Manual de Instrucciones de operación Selecta. 1999. Manual de Instrucciones de operación Agitadores Magnéticos electrónicos con o sin calefacción Barcelona E.
21. JP. Selecta. 1999. Manual de Instrucciones de operación Armarios refrigeradores. Barcelona E.
22. JP. Selecta. 1999. Manual de Instrucciones de operación Autoclave Barcelona E.
23. JP. Selecta. 2000. Manual de Instrucciones de operación Incubador con CO₂ Barcelona E.
24. Nikon. 2000. Manual de Instrucciones de operación Microscopio Eclipse E400.
25. Pelczal M. y Otros. 1989. Microbiología. 4a ed. México. Mc Graw – Hill. Pág. 58-60.
26. Raypa. 2001 Manual de Instrucciones de operación. Baño Digital Termostático. Barcelona .3-5

27. Seward. 1998. Manual de Instrucciones de operación Stomacher Londres 9
-13, 13-16,
28. Stedman .Diccionario de Ciencias Medicas. 25^a ed. Editorial medica
panamericana.
29. Tecnum. 2004 Libro electrónico Ciencias de la tierra y del medio ambiente
www.tecnun.es/asignatura/ecologia
30. Telstar. 2000. Manual de Instrucciones de operación Cabina de flujo
Laminar Barcelona E.
31. Williams S. 1984, Métodos Oficiales de Análisis de la Asociación de
QUIMICOS Oficiales Analíticos (AOAC), 14^a edición, USA, editorial AOAC.

GLOSARIO

- Acreditación: reconocimiento legal que otorga el CONACYT a todo laboratorio de calibración y ensayo que cumple con la norma ISO / IEC 17025, en la que se plantean los requerimientos necesarios para demostrar que este opera bajo un sistema de calidad, que es técnicamente competente y es capaz de generar resultados técnicamente validados. ⁽⁶⁾
- Calibración: conjunto de operaciones que establecen en condiciones especificadas la relación entre los valores indicados por un instrumento de medición, un sistema de medición o los valores representados por una medida materializada y los correspondientes valores conocidos de una determinada magnitud medida. ⁽¹⁷⁾
- CONACYT: organismo de normalización de la República de El Salvador que representa al país ante las organizaciones internacionales y regionales de normalización, y se encarga de aspectos como la regularización de procedimientos relativos a la acreditación de laboratorios de calibración y análisis. ⁽⁶⁾
- Contaminación: presencia de cualquier material extraño que hace impura a una sustancia o preparación ⁽²⁸⁾.
- Ensayo: operación técnica que consiste en determinar una o varias características o el comportamiento de un producto, material, equipo,

organismo, fenómeno físico, proceso o servicio dado, de acuerdo con un procedimiento establecido ⁽²⁷⁾

- Fermentación: desasimilación anaeróbica de sustratos con la producción de energía y compuestos reducidos ⁽²⁸⁾
- Fisión: acto de desdoblamiento por ejemplo la división ametótica de una célula o de su núcleo. ⁽²⁸⁾
- Gemación: fisión por yemas. ⁽²⁸⁾
- Microorganismo patógeno: cualquier virus o microorganismo que causa enfermedad. ⁽²⁸⁾
- Norma ISO 17025: es un modelo que especifica los requerimientos que un laboratorio debe tener como mínimo para llevar a cabo pruebas o calibraciones. ⁽⁶⁾
- Política: es una guía para decisiones administrativas que fija los límites y los campos en que las personas autorizadas pueden tomar decisiones y realizar actos administrativos. ⁽⁶⁾
- Procedimiento: es una serie de labores concatenadas que constituyen una sucesión cronológica y el modo de ejecutar un trabajo encaminados al logro de un fin determinado. ⁽⁶⁾

- Sistema de Calidad: comprende la estructura organizativa, responsabilidades, actividades, recursos y eventos de organización que proporcionan en conjunto procedimientos y métodos organizados de ejecución para garantizar la capacidad de la organización de reunir los requisitos de calidad. ⁽¹⁷⁾

- Trazabilidad: propiedad de un resultado de una medición, la que consiste en poder relacionarlo con patrones adecuados, en general patrones internacionales o nacionales, a través de una cadena ininterrumpida de comparaciones. ⁽¹⁷⁾

- Validación de métodos: es un proceso por medio del cual se determinan y evalúan los atributos o figuras de mérito para determinar la conveniencia de la metodología para proporcionar resultados analíticos. ⁽⁶⁾

ANEXOS

ANEXO N^o1

FORMATO DE ENTREVISTA



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

ENTREVISTA A LABORATORIOS QUE SE ENCUENTRAN ACREDITADOS
EN EL PAIS Y QUE REALIZAN ANÁLISIS DE ALIMENTOS

NOMBRE DEL
LABORATORIO: _____

DIRECCIÓN: _____

NOMBRE DEL
ENTREVISTADO: _____

CARGO DENTRO DEL
LABORATORIO: _____

1. ¿Cuánto tiempo le llevo efectuar el proceso de Acreditación?
2. ¿Cuánto tiempo tienen de contar con dicho reconocimiento?
3. ¿Que procedimientos de Análisis se encuentran Acreditados?
4. ¿En cuantas ocasiones les han realizado inspectorias desde que se aprobó la Acreditación?
5. ¿Por cuánto tiempo es valida la Acreditación?
6. ¿Qué ventajas o desventajas han encontrado al obtener el reconocimiento de Acreditación?
7. ¿A que tipo de Instituciones les efectúan los Análisis?

8. ¿Poseen un diagrama de flujo de manejo de muestra cuando esta llega al laboratorio?
9. ¿Cuál es la metodología que utilizan para realizar el muestreo?
10. ¿Con qué tipo de Equipo cuentan para relizar los análisis?
11. ¿Cuentan con un manual de instrucciones de manejo del equipo que utilizan para realizar los análisis?
12. ¿A que tipo de alimentos realizan los análisis?
13. ¿Qué metodología analítica básica utilizan para realizar los análisis?
14. ¿Para que tipo de microorganismos realizan los análisis?
15. ¿Poseen Organismos de Prueba o Cepario (Bacterioteca)?
16. ¿En que forma llevan el registro de datos de los análisis que realizan?
17. ¿Cuentan con una Bodega para almacenar medios de cultivos y reactivos y cuales son las condiciones de almacenamiento?
18. ¿Efectúan pruebas de Reactividad?
19. ¿Tienen o no sus áreas analíticas separadas e identificadas?
20. ¿Poseen un Manual de Seguridad?

ANEXO N_o2

FORMATO DE PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS SEGÚN NORMA ISO/ IEC 17025

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO	Código: ALI –01 –P.00
	NOMBRE DEL PROCESO DE PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS	Página de Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

- A. **OBJETIVO:** en esta parte se detalla lo que se pretende con el procedimiento estándar.
- B. **ALCANCE:** aquí se hace mención a que muestras es aplicable dichos procedimientos
- C. **TERMINOS Y DEFINICIONES:** en este apartado se definen los principales conceptos y términos técnicos y científicos del procedimiento
- D. **POLÍTICA:** son las actividades con las que el laboratorio se compromete para lograr la máxima calidad del procedimiento.
- E. **.RESPONSABILIDAD:** en esta parte se designa al responsable de la ejecución y supervisión a lo largo del procedimiento.
- F. **REGISTROS DE CALIDAD**
- G. **DESARROLLO:** esta parte se desarrollan los siguientes puntos:
Introducción, equipo y medios de cultivo, procedimiento, cálculos, criterios de aceptación, aseguramiento de la calidad, diagrama de flujo.
- H. **BIBLIOGRAFIA Y/O DOCUMENTOS DE REFERENCIA**
- I. **ANEXOS.**

ANEXO N^o 3

FORMATO DE INSTRUCCIONES DE MANEJO DE EQUIPO

	INSTRUCCIONES DE MANEJO DEL EQUIPO	Código: ALI –01 –IE.00
		Página de
		Vigente a partir de:
Elaborado por:	Revisado por:	Autorizado por:

- I. **INTRODUCCION:** en ella se explica de forma general la descripción y uso del equipo.
- II. **ESPECIFICACIONES Y PARETES DEL EQUIPO:** se detallan las condiciones propias del equipo para su buen funcionamiento, proporcionadas por el fabricante. además se describen las partes por las que esta conformado el equipo.
- III. **PROCEDIMIENTO:** es el desarrollo de las Instrucciones a utilizar para el buen manejo y funcionamiento del equipo.
- IV. **LIMPIEZA DEL EQUIPO:** se describe la forma en la que se debe realizar la limpieza de cada una de las partes de éste, para mantenerlo en optimas condiciones.
- V. **TERMINOS Y DEFINICIONES:** en este apartado se definen los principales conceptos y términos técnicos y científicos del procedimiento.
- VI. **BIBLIOGRAFÍA:** en ellos se enumeran los libros de referencia y demás fuentes consultadas.
- VII. **HOJA DE VIDA:** contiene el nombre del equipo, marca, código, serie y un cuadro de registro de uso.

ANEXO N_o 4

PROCEDIMIENTO PARA LA TINCION DE GRAM

1. Fijar el frotis con calor
2. Cubrir con cristal violeta por 1 min.
3. Lavar con agua (no secar)
4. Cubrir con yodo (lugol) por 1 min.
5. Lavar con agua (no secar)
6. Decolorar por 10 a 30 seg. con agitación suave en acetona (30mL) y alcohol 70mL)
7. Lavar con agua (no secar)
8. Cubrir por 10 a30 seg. con Safranina (solución al 2.5%) en alcohol 95%.
9. Lavar con agua y permitir que seque

ANEXO N^o 5

LIMITES MICROBIANOS

BEBIDAS NO CARBONATADAS SIN ALCOHOL NSO 67.18.01:01

Bebidas no carbonatadas sin alcohol, (refrescos): es una bebida no alcohólica que no contiene dióxido de carbono (anhídrido carbónico) disuelto, elaborada a partir de agua potable que cumple con la norma NSO 13.07.01:97, adicionado con azúcar y otro edulcorante permitido, saborizantes naturales o artificiales y/o de jugos o concentrado de frutas, colorantes naturales o artificiales y acidificantes, con o sin la adición de sustancias preservantes, vitaminas y otros aditivos alimentarios permitidos y que han sido sometidos a un proceso tecnológico adecuado.

TABLA 1. CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LAS BEBIDAS NO CARBONATADAS SIN ALCOHOL

Microorganismos	Recuento Máximo Permitido
Recuento de microorganismos aerobios (mesófilos) en placa, en unidades formadoras de colonias (UFC), por mililitro.	<1000
Recuento de hongos y levaduras, en unidades formadoras de colonias (UFC/mL).	<20
Bacterias coliformes, en número más probable (NMP) por 100 mL	<1.1 ²⁾
Bacterias patógenas	ausencia
Contenido de hongos, en campos positivos por cada 100 campos. Método Howard	<20

LECHE CRUDA DE VACA NSO 67.01.01:96

Leche cruda de vaca: es el producto íntegro, no alterado ni adulterado, del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de vacas sanas; que no ha sufrido ningún tratamiento a excepción del filtrado y/o enfriamiento; que no contiene calostro y está exento de color, olor, sabor y consistencia anormales.

TABLA 2. REQUISITOS MICROBIOLÓGICOS (1) PARA LECHE CRUDA DE VACA

Requisito	Clase A	Clase B	Clase C
Recuento de microorganismos por cm ³ , antes de la pasteurización	400 000, máximo	800 000, máximo	1 x 10 ⁶ , máximo

(1)Valores sujetos a revisión en un período de dos años

LECHE PASTEURIZADA NSO 67.01.02:96

Leche pasteurizada: es la leche de vaca entera, semidescremada o descremada, que ha sido sometida a un proceso de calentamiento en condiciones de temperatura y tiempo que aseguren la total destrucción de la microflora patógena y casi la totalidad de la microflora no patógena.

Características microbiológicas: la leche pasteurizada, en cualquiera de sus tipos, no deberá contener microorganismos en número mayor a lo especificado en la siguiente tabla:

TABLA 3. CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LECHE PASTEURIZADA

Microorganismo	UFC/mL
Recuento total de bacterias, máximo	10 000
Coliformes totales	< 10
<i>E. coli</i>	Ausente

HELADOS Y MEZCLAS DE HELADOS. Especificaciones NSO 67.01.11:95

Helados o sorbetes: Son los productos obtenidos a partir de la mezcla pasteurizada, homogenizada, batida y refrigerada por medios manuales o mecánicos que tenga en su composición grasa butírica en forma de crema, mantequilla o en polvo, proteína láctea en forma de sólidos de leche, edulcorantes tales como azúcar, glucosa, dextrosa en forma líquida o sólida, estabilizantes y emulsificantes alimenticios, saborizantes y colorantes naturales y artificiales, agua potable.

Mezclas líquidas pasteurizadas para helados o sorbetes: es el producto líquido que contiene todos los ingredientes necesarios, en las cantidades apropiadas, de manera que al someterlo a proceso de congelamiento, de como resultado un producto alimenticio que se ajuste a la definición del helado o sorbete correspondiente.

Los helados o sorbetes no deberán contener microorganismos en un número mayor a lo especificado en la siguiente tabla:

TABLA 4. CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE LOS HELADOS.

Microorganismos	sugerido UFC	aceptado UFC
Recuento total, por gramo	2.5×10^4	5×10^4
Coliformes, por gramos	10	102
<i>Salmonella sp</i> , en 25 g	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> , por gramo	0	10^2
<i>Escherichia coli</i> , por gramo	0	0

Las mezclas líquidas para helados no deberán contener microorganismos en un número mayor a lo especificado en la siguiente tabla:

TABLA 5. CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE LAS MEZCLAS LÍQUIDAS PARA HELADOS.

Microorganismos	sugerido UFC	Aceptado UFC
Recuento total, por gramo ó mL	2.5×10^4	5×10^4
Coliformes, por gramos ó ML	10	102
<i>Salmonella sp</i> , en 25 g ó ML	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> , por gramo o ML	0	10^2
<i>Escherichia coli</i> , por gramo ó mL	0	0

MANTEQUILLA. Especificaciones NSO 67.01.12:95

Mantequilla: es el producto graso fresco o madurado por la adición de cultivos lácticos seleccionados, obtenido exclusivamente de la crema de la leche de vaca.

La mantequilla deberá cumplir con criterios los microbiológicos establecidos en la siguiente tabla:

TABLA 6. CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LA MANTEQUILLA

Características microbiológicas	Producto elaborado a partir de crema fresca sin madurar	Producto elaborado a partir de crema madurada
microorganismos patógenos por gramo	negativo	Negativo
gérmenes del grupo coliforme, por gramo, máximo	10	10
<i>E. coli</i>	negativo	Negativo
hongos y levaduras, por gramo, máximo	20	20
Colonias de gérmenes proteolíticos, por gramo, máximo	50	50

CREMAS LÁCTEAS PASTEURIZADAS PARA EL CONSUMO DIRECTO.

Especificaciones NSO 67.01.08:95

Crema: se entiende por crema el producto lácteo relativamente rico en grasa separado de la leche y que adopta la forma de una emulsión de un tipo de leche descremada con grasa. La composición final puede ajustarse mediante la adición de leche o leche descremada.

Cremas pasteurizadas: son las que han sido sometidas a un proceso de pasteurización ó un tratamiento térmico reconocido, similar o equivalente.

Cremas esterilizadas: son las que han sido sometidas a un proceso de esterilización mediante un tratamiento térmico reconocido.

Cremas UHT: son las cremas tratadas a temperaturas ultraelevadas (UHT) o cremas pasteurizadas que han sido sometidas de modo continuo a un procedimiento UHT o de ultrapasteurización, según un tratamiento térmico reconocido, y han sido envasadas en condiciones asépticas.

TABLA 7. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Microorganismos	N (1)	c (2)	m (3)	M (4)
<i>Staphylococcus aureus</i> , UFC/cm ³	5	2	10	10 ²
Coliformes totales, UFC/cm ³	5	2	10	10
Coliformes fecales, UFC/cm ³	5	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> , UFC/cm ³	5	0	0	0
<i>Salmonella sp</i> en 25 gramos	5	0	0	0
Recuento total de bacterias aeróbicas mesófilicas, UFC/cm ³ *	5	3	3x10 ⁴	5x10 ⁴
Hongos y levaduras	5	1	10	20
Prueba de fosfatasa	5	0	0	0

* Solo a cremas no cultivadas

(1) n =Número de muestras que debe analizarse

(2) c =Número de muestras que se permite tengan un recuento mayor que *m* pero no mayor que *M*.

(3) m =Recuento máximo recomendado.

(4) M =Recuento máximo permitido.

YOGUR. Especificaciones Técnicas NSO 67.01.10:95

Yogur: es el producto lácteo pasteurizado obtenido por fermentación láctica mediante la acción de ***Lactobacillus bulgaricus*** Y ***Streptococcus thermophilus*** a partir de leche entera, semidescremada o descremada fortificada o no con sólidos de leche. Los microorganismos presentes en el producto final deberán ser de los tipos antes mencionados y su contenido abundante.

Yogur natural o simple: es el yogur que no lleva colorantes, aromatizantes ni edulcorantes.

Yogur azucarado: es el yogur al que se han añadido únicamente azúcar.

Yogur saborizado aromatizado: es el yogur natural adicionado de sustancias aromatizantes, saborizantes y colorantes naturales o artificiales autorizados.

Yogur con fruta: Es el yogur al cual se han añadido alimentos aromatizantes u otros ingredientes tales como: frutas (frescas, en conserva, en polvo), puré de fruta, pulpa de fruta, jugo de fruta y otros ingredientes naturales o artificiales autorizados.

El yogur deberá cumplir con los requisitos especificados en la siguiente tabla:

TABLA. 8 CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DEL YOGUR

Limites Máximos Permitidos	Limite (ufc)
Coliformes por gramo, máximo	10
<i>Escherichia coli</i> por gramo	Negativo
Levaduras y mohos por gramo, máximo	200
Prueba fosfatasa	Negativo

PRODUCTOS DE IMITACIÓN DE LA CREMA DE LECHE. Especificaciones

NSO 67.01.09:95

Productos de imitación de la crema de leche. Son productos que en su contenido graso y aspecto general, así como por el uso a que se destinan, son semejantes a la crema de leche. Los constituyentes sólidos de la crema de leche han sido parcialmente sustituidos por aceites y/o grasas vegetales.

Nota. También se designan como productos sustitutos de la crema de leche.

Características microbiológicas. El producto no deberá contener microorganismos en número mayor a lo especificado en la siguiente tabla:

TABLA. 9 CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE PRODUCTOS DE IMITACION DE LA CREMA DE LECHE

Microorganismo	n (1)	c (2)	m (3)	M (4)
<i>Staphylococcus aureus</i> , UFC/cm ³	5	2	10	10 ²
Coliformes totales, por gramo	5	1	10	10
Coliformes fecales, por gramo	5	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> , por gramo	5	0	0	0
Recuento total de bacterias aeróbicas mesófilas, UFC/cm ³	5	3	4X10 ⁴	6X10 ⁴
Hongos y levaduras	5	0	0	20
Prueba de fosfatasa	5	0	0	0
<i>Salmonella sp</i> en 25 gramos	5	0	0	0

- (1) n =Número de muestras que debe analizarse.
 (2) c =Número de muestras que se permiten que tengan un recuento mayor que m pero no mayor que M.
 (3) m =Recuento máximo recomendado.
 (4) M =Recuento máximo permitido.

HARINAS. HARINA DE TRIGO NSO 67.03.01:01

Harina de trigo: es el producto que se obtiene de la molienda y tamizado del grano de diferentes clases o subclases de trigo, limpio, sano, y libre de impureza o materias extrañas que alteren la calidad del producto. La molienda y tamizado se llevan a cabo hasta un grado de extracción determinado, considerando como subproductos el germen, afrecho-harinilla (salvado), y harinas de tercera.

TABLA. 10 CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA HARINA DE TRIGO

Microorganismos	Recuento Preferible, UFC	Recuento Máximo, UFC
Recuento bacterias mesófilas/g	100	50 000
Recuento mohos y levaduras/g	100	200
Recuento coliformes/g	10	100
Coliformes fecales/g	0	0
Salmonella sp /25 g	Ausencia	Ausencia

HARINAS. HARINA DE MAÍZ NIXTAMALIZADO NSO 67.03.02:03

Harina de maíz nixtamalizado fortificada: es la harina de maíz nixtamalizado a la que se han agregado micronutrientes para obtener un producto con mayor valor nutricional, en las proporciones establecidas en la presente Norma.

Harina de maíz nixtamalizado: el producto deshidratado que se obtiene de la molienda de los granos de maíz (*Zea mays*) sometido a cocción parcial con agua en presencia de hidróxido de calcio.

Los criterios microbiológicos para efectos de higiene son los permitidos en la siguiente tabla:

TABLA. 11 RECUEENTOS PERMITIDOS

Microorganismos	Recuento Preferible, UFC	Recuento Máximo, UFC
Recuento bacterias mesófilas	100	1 000 000
Recuento de mohos y levaduras	100	10 000
Coliformes totales	10	100
Coliformes fecales	0	0
Salmonella sp	Ausencia	Ausencia

CARNE Y PRODUCTOS CARNICOS. EMBUTIDOS CRUDOS Y COCIDOS.

NSO 67.02.13:98

Embutidos: son los productos elaborados en base a una mezcla de carne de res y/o carne de cerdo y otros animales de consumo autorizado por el organismo competente, adicionada o no de despojos comestibles, grasa de cerdo, condimentos, especias y aditivos alimentarios, uniformemente mezclados, con agregado o no de sustancias aglutinantes y/o agua helada o hielo, introducida en tripas naturales o artificiales y sometida o no a uno o más de los procesos tecnológicos de curado, cocción, deshidratación y ahumado.

Carne: es la parte comestible, sana y limpia de la musculatura esquelética de bovinos, ovinos, porcinos, caprinos y otros animales de consumo autorizado por el organismo competente. Por extensión se designa también como carne y/o carne mecánicamente deshuesada (CDM), la de las especies de consumo autorizado por el organismo competente tales como animales de corral, caza, peces, crustáceos y moluscos.

Despojo comestible: es cualquier otra parte comestible fuera de la carne, tal como fue definida anteriormente, los cuales se derivan del ganado vacuno, lanar, porcino, caprino u otros animales de consumo autorizado por el organismo competente. Esta definición incluye: cerebro timo, páncreas, hígado, riñón, corazón, estómago y sangre. Por extensión se designan también como despojos comestibles, los de las aves de corral (gallinas, pavos, patos y gansos) e incluye hígado, corazón, riñón, molleja y piel.

Embutidos crudos: son los que en su elaboración no reciben ningún tipo de tratamiento térmico, pudiendo ser ahumado o no ahumado.

Embutidos crudos frescos: son aquellos cuyo término de durabilidad es limitado. Para su conservación prolongada necesitan congelación.

Embutidos crudos madurados: son aquellos que en su elaboración han sido sometidos a un proceso de maduración o curado, para favorecer su conservación por un lapso de tiempo prolongado.

Embutidos cocidos: son los que en su procesamiento alcanzan temperaturas internas superiores a 65 °C.

Aglutinante: es la sustancia que se adiciona con el objeto de obtener una adecuada ligazón entre los constituyentes del embutido.

Salami: es el embutido elaborado en base a una mezcla de carne, grasa de cerdo, especias y aditivos alimentarios, adicionado o no de vino, y sometido o no a uno o más de los procesos tecnológicos de curado, cocción, deshidratación y ahumado. La carne puede ser exclusivamente de res o una mezcla de carne de res, como constituyente principal, carne de cerdo y otros animales de consumo autorizado.

Nota 1. La carne de res podrá reemplazarse hasta en un 20% por corazón de res.

Mortadela y salchicha: es el embutido elaborado en base a una mezcla de carne de res, de cerdo o de aves de corral, como constituyente principal, y de otros animales de consumo autorizado, grasa de cerdo, sustancias aglutinantes,

agua o hielo, especias y aditivos alimentarios; adicionada de hortalizas, hierbas aromáticas y otros vegetales crudos o cocidos, autorizados por el organismo competente; adicionada o no de trozos de grasa dura de cerdo, que permanecen enteros distribuidos en la mezcla anterior, sometida a cocción; y sometida o no a los procesos de curado y ahumado.

Salchichón: es el embutido elaborado en base a una mezcla de carne de res como constituyente principal, carne de cerdo y otros animales de consumo autorizado, grasa de cerdo, sustancias aglutinantes, especias y aditivos alimentarios y sometida al proceso de curado. Adicionalmente puede o no someterse a los procesos de cocción, deshidratación y ahumado.

Chorizo: es el embutido elaborado en base a una mezcla de carne de cerdo y/o carne de res, grasa de cerdo, aves de corral, especias y aditivos alimentarios, sometida o no a uno o más de los procesos de cocinado, curado, deshidratado y ahumado.

Jamonada: es el embutido elaborado en base a una mezcla de carne de cerdo o carne de cerdo y carne de res o carne de otros animales de consumo autorizado, grasa de cerdo, sustancias aglutinantes, agua o hielo, especias y aditivos alimentarios. Adicionada o no de trozos de carne de cerdo y sometida a los procesos de curado y cocción; adicionalmente puede o no ser ahumada.

Nota 2. Este producto se comercializa también como jamón.

Butifarra: es el embutido elaborado en base a una mezcla de carne de cerdo, carne de res, grasa de cerdo, especias y aditivos, molidos y uniformemente

mezclados, y sometidos al proceso de cocción. Al producto no se le agrega nitratos ni nitritos por lo cual su color característico es el color café grisáceo.

Paté: es el embutido elaborado en base a una mezcla de hígado de aves, cerdo o res, adicionada o no de carne de ave, cerdo o res, grasa de cerdo, especias y aditivos, y sometida al proceso de cocción; adicionalmente el producto puede o no ser ahumado.

CARACTERISTICAS MICROBIOLOGICAS

Los límites para las características microbiológicas se detallan en la tabla

Límites Microbiológicos

TABLA 12 LIMITES MICROBIANOS PARA CARNES Y PRODUCTOS CARNICOS

Producto	Recuento total aeróbico a 32 °C	Salmone lla sp	Staphylo coccus Aureus	Clostri dium perfringes	Escherichia coli		Coniformes Totales		Listeria monocytogenes
					UFC/g	NMP/g	UFC/g	NMP/g	
Precocido listo para comer (mortadela)	1 x 10 ⁵ UFC/g máx.	ausente en 25 g	10 UFC/g máx.	10 UFC/g máx.	10 máx.	0.4 máx.	100 máx.	15 máx.	ausencia/g
Precocido, normalmente requiere cocimiento antes de ser consumido (salchicha hot dog)	1 x 10 ⁵ UFC/g máx.	ausente en 25 g	10 UFC/g máx.	10 UFC/g máx.	10 máx.	0.4 máx.	100 máx.	15 máx.	ausencia/g
Crudo, requiere cocimiento antes de ser consumido (longaniza, salchicha de desayuno)	1 x 10 ⁶ UFC/g máx.	ausente en 10 g	100 UFC/g máx.	100 UFC/g máx.	100 máx.	15 máx.	1000 máx.	150 máx.	ausencia/g
Curados, pueden ser ingeridos sin cocción adicional (chorizo extremeño, salami italiano)	1 x 10 ⁵ UFC/g máx.	ausente en 25 g	10 UFC/g máx.	10 UFC/g máx.	10 máx.	0.4 máx.	100 máx.	15 máx.	ausencia/g

QUESOS MADURADOS. especificaciones NSO 67.01.03:95

Queso: es el producto fresco o madurado, sólido o semisólido, obtenido por la coagulación de leche entera, leche descremada, leche parcialmente descremada, crema, crema de suero, o suero de mantequilla; o una combinación cualquiera de éstas, por la acción de cuajo u otros coagulantes apropiados, con o sin aplicación de calor, y con o sin la adición de otros ingredientes y aditivos alimentarios.

Queso madurado: es el queso que no está listo para su consumo inmediatamente después de su fabricación sino que debe mantenerse durante determinado tiempo, a una temperatura y condiciones específicas para cada tipo de queso con el objeto de permitir que bacterias, mohos o enzimas, produzcan transformaciones del queso no madurado que den al producto final, el sabor, la textura y la apariencia propios del tipo de queso a ser fabricado.

Características microbiológicas: el producto no deberá contener microorganismos en número mayor a lo especificado en la siguiente tabla:

TABLA. 13 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Microorganismos	n (1)	c (2)	m (3)	M (4)
<i>Staphylococcus aureus</i> , UFC/cm ³	5	1	10 ²	10 ³
Coliformes totales, UFC/cm ³	5	2	100	200
Coliformes fecales, UFC/cm ³	5	1	10	10
<i>Escherichia coli</i> , UFC/cm ³	5	0	0	0
<i>Salmonella</i> en 25 gramos	5	0	0	0

- (1) n =Número de muestras que debe analizarse.
- (2) c =Número de muestras que se permite que tengan un recuento mayor.
- (3) m =Recuento máximo recomendado.
- (4) M =Recuento máximo permitido.