



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

ELABORACION DEL MANUAL DE PROCEDIMIENTOS  
NORMALIZADOS DE TRABAJO PARA LOS ANALISIS  
MICROBIOLOGICOS Y DOCUMENTACION DE LA  
NOM-089-SSA, 1-1994. BIENES Y SERVICIOS. METODOS  
PARA LA DETERMINACION DEL CONTENIDO MICROBIANO  
EN PRODUCTOS DE BELI EZA LLEVADOS A CABO EN UNA  
EMPRESA COSMETICA.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

**P R E S E N T A :**

**ROSA TRIANA JUAREZ**

ASESOR: M.C. ANDREA A. BECERRIL OSNAYA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Elaboración del Manual de Procedimientos Normalizados de Trabajo para los Análisis Microbiológicos y Documentación de la NOM-089-SSA, 1-1994. Bienes y Servicios. Métodos para la determinación del contenido microbiano en productos de belleza llevados a cabo en una Empresa Cosmética.

que presenta la pasante: Rosa Triana Juárez  
con número de cuenta: 9301158-3 para obtener el título de :  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**A T E N T A M E N T E**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 15 de diciembre de 2004

PRESIDENTE	<u>MVZ. Gerardo Cruz Jiménez</u>	
VOCAL	<u>QFI. Andrea A. Becerril Osnaya</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Adriana Ganem Rondero</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QFB. René Damián Santos</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>QFB. Ana Laura Vázquez Martínez</u>	

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por haberme dado a la mejor familia que pude haber tenido, por que gracias a su esfuerzo y apoyo de todos ellos pude lograr ser un profesionista.

Te agradezco que me hayas dado como herencia mi carrera. Gracias Papá.

Durante todos los años que he estudiado tu siempre estabas al pendiente de mi, apoyándome, dándome ánimos y mucha suerte, gracias por estar conmigo te quiero mucho mamita.

Eva:

Tu me decías que hay tiempo para todo, que disfrutara mi carrera y que fuera puma de corazón y gracias a tu ejemplo aprendí a querer y apasionarme de cada cosa que ago.

Gracias por haber sido mi proveedora de lo que necesitaba para poder estudiar.

Mis hermanas:

Eva, Guadalupe y Xochilth gracias por sus consejos, apoyo y sobre todo a su tolerancia y por que nunca dejaron que me desanimara.

Agradezco a mi querida UNAM y a mis profesores por haberme recibido y formado en sus aulas.

A la profesora Andrea Becerril le doy las gracias por el apoyo y tiempo que me brindo para poder realizar este trabajo.

## DEDICATORIAS

Este trabajo esta especialmente dedicado a mi, para que nunca se me olvide que las metas se logran con esfuerzo, sacrificio y fe.

Se la dedico a mi papá y a mi mamá y espero que también sientan como suyo este triunfo los quiero mucho.

Se la dedico con mucho cariño a las TRIANAS (mis hermanas Eva, Lu y Chocho); por que siempre hemos estado juntas, apoyándonos y por que ya voy a tener un lugar en la pared de honor junto a ellas.

A mis amigas: Claudia y Natalia por que si no hubiera sido por esas parrandas y terapias de fin de semana no tendría que platicarle a mis nietos.

A mi amiga Araceli con mucho cariño por todos esos largos y tediosos reportes, tareas, investigaciones, etc.; que hicimos juntas, te dedico esta tesis por que tu tuviste mucho que ver para que yo lograra terminar mi carrera.

## INDICE

	Pág.
Índice general	1
Resumen	3
Introducción	5
Objetivos	7
<b>SISTEMA DOCUMENTAL</b>	
<b>CAPITULO 1</b>	
LOS MANUALES	9
1.1 Definición	9
1.2 Los manuales de procedimientos	9
1.2.1 Contenido típico de los manuales de procedimientos	10
<b>CAPITULO 2</b>	
LOS METODOS Y PROCEDIMIENTOS	11
2.1 Definiciones	11
2.2 La técnica del libreto	11
2.3 El mejoramiento de los procedimientos	12
<b>CAPITULO 3</b>	
DOCUMENTACIÓN DEL SISTEMA DE CALIDAD	13
3.1 Manuales descriptivos	13
3.1.1 Nivel 1	13
3.1.2 Nivel 2	14
3.1.3 Nivel 3	15
3.2 Registros de calidad	15
<b>CRITERIOS PARA EL DESARROLLO DE UN PROGRAMA DE ASEGURAMIENTO DE CALIDAD</b>	
<b>CAPITULO 4</b>	
IMPLEMENTACION DE UN PROGRAMA DE ASEGURAMIENTO DE CALIDAD	18
4.1 Introducción	18
4.2 Personal	18
4.3 Medios de cultivo	19
4.4 Métodos	20
4.5 Equipos	20
4.6 Tratamiento de muestras	21
4.7 Tratamiento de datos	21

4.8 Sistemas de control de calidad	21
4.9 Seguimiento	22

## **CONTROL MICROBIOLÓGICO**

<b>CAPITULO 5</b>	24
<b>CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LOS COSMÉTICOS</b>	24
5.1 Origen de las contaminaciones	24
5.1.1. Contaminaciones durante el proceso de fabricación	24
1. Las Materias primas	24
2. Áreas de almacenamiento	25
3. Locales y materiales	25
4. El personal	26
5.1.2. Contaminaciones posteriores a la fabricación	27
1. Contaminaciones debidas al acondicionamiento o envase	27
2. Contaminaciones debidas al consumidor	27
5.2 Naturaleza de los contaminantes	27
5.3 Consecuencias de las contaminaciones	28
1. En el plano, para el consumidor	28
2. En el terreno económico, para el fabricante	28
Resultados	29
Procedimientos normalizados de operación generales	30
Procedimientos normalizados de operación específicos	32
Discusión	33
Conclusiones	33
Bibliografía	34

## RESUMEN

El reglamento de Control Sanitario de productos y servicios 09/08/1999, Título Vigésimo segundo: productos de perfumería, belleza y aseo, en su artículo 188 cita como responsables de la calidad sanitaria a los fabricantes, y en su artículo 192 a la letra “Se deberán efectuar controles microbiológicos en la fabricación de los siguientes productos:

- I. Productos para la piel: Cremas, lociones, talcos y polvos, maquillajes, lápices labiales, bronceadores, autobronceadores, protectores o filtros y bloqueadores solares.
- II. Productos para el área de los ojos: Sombras, delineadores, rimel o mascara para pestañas y desmaquillantes.
- III. Productos para niños: Talcos, polvos, aceites, cremas y lociones crema.”

Para cumplir con dicho reglamento la Secretaria de salud pone a disposición la NOM-089-SSA, I-1994. Bienes y Servicios. Métodos para la determinación del contenido microbiano en productos de belleza.

La implementación de la norma permite, desarrollar sistemas de calidad y asegurar la presencia de nuestros productos en el mercado.

El objetivo del control Microbiológico de un producto cosmético es doble:

- Primeramente: Garantizar la seguridad del consumidor permitiendo evitar que se comercialicen productos que contengan microorganismos, los cuales, por su naturaleza o cantidad, puedan representar un riesgo para la salud de aquél.
- En segundo lugar: Asegurar al producto una buena calidad general bajo el punto de vista organoléptico y una buena conservación en el tiempo.

Los Procedimientos Normalizados de Trabajo son todos aquellos procedimientos escritos que describen cómo deben realizarse determinadas operaciones de laboratorio o cualquier otra actividad. Estos documentos son los conocidos por las siglas SOP's (Standar Operating Procedures) siendo su objetivo principal:

1. Reducir los riesgos de equivocación por parte de las personas que realicen un experimento.
2. Estandarizar métodos.
3. Minimizar la introducción de posibles errores.

Los SOP's son muy importantes ya que aseguran el cumplimiento de las técnicas de rutina de forma normalizada y los métodos utilizados son conocidos con claridad. También permiten la continuidad profesional del personal hacia distintas técnicas y minimizan la influencia que puede existir por el cambio de personal en un momento dado.



Un procedimiento incluyendo uno o varios métodos, se materializa en un conjunto de actividades, procesos formados por un número indeterminado de mecanismos relacionados, normalmente de forma secuencial.

Este trabajo integra las actividades que se llevan a cabo en un laboratorio de microbiología, establece una estructura documental basada en normativas de la serie ISO 9000, dando como resultado un manual de procedimientos normalizados de operación constituido por dos grupos de documentación:

- Procedimientos Generales
- Procedimientos Específicos

La información que contienen estos documentos aseguran el cumplimiento de la NOM-089, sin pasar por alto los lineamientos de calidad marcados por el cliente.

Los formatos y códigos pertenecen a Swan Cosmetics S.A. de C.V., empresa para la cual se realizó este manual.

## INTRODUCCIÓN

Una de las cualidades que más aprecia una empresa de sus empleados es la experiencia, ya que con ella una persona resuelve problemas, le ayuda a la organización a alcanzar sus objetivos de negocio, y sobre todo le ayuda a adquirir una buena posición competitiva en el mercado.

La habilidad que se adquiere con la práctica, es una cualidad que todo empleado busca desarrollar, para ser reconocido y valorado en su trabajo.

El grado de experiencia depende del nivel de conocimientos y de la profundidad de entendimiento que tenga el trabajador sobre una materia o tema en particular, esto le ayuda desarrollar el hábito de refinar continuamente las técnicas que utilizan, en pro de asegurar la calidad y los resultados de su trabajo: *Técnicas deficientes o mal empleadas, dan excusas; Técnicas eficientes o bien empleadas, dan resultados.*

En una compañía, la destreza de cada directivo y colaboradores es muy valiosa, pues contribuye directamente a su fortalecimiento. De hecho, la experiencia y las técnicas que usa una organización conforman su tecnología, si ésta se documenta adecuadamente, adquiere un valor invaluable para la propia organización, porque además de enriquecerse (técnicamente hablando), tiene una base de la cual partir para seguir creciendo y desarrollándose. El documentar las actividades de cada puesto facilita que el personal de nuevo ingreso o promovido, pueda rápidamente generar un nuevo conjunto de técnicas. *La tecnología de una organización es después de sus colaboradores, su activo más valioso.*

Por supuesto, los manuales en donde se documenta la tecnología de una organización, no pretenden suprimir las habilidades y el sentido común del personal que allí labora, lo que tratan es que en lugar de que la gente diariamente apague fuegos y desperdicie su talento, se dedique a mejorar los sistemas de trabajo y el nivel de competitividad de la organización.

Los manuales documentan la experiencia de la organización, incluyendo claramente lo que ha probado ser útil, considerando lo que los procesos si deben o no hacer para que estos cumplan con su razón de ser de una manera más eficiente.

El término de tecnología tiene muchos significados, desde una connotación específica hasta una connotación general. Desde el punto de vista más estrecho, éste término se asocia con el de tecnología de maquinaria, los medios mecánicos para la producción de bienes y servicios y el reemplazo del esfuerzo humano, en el sentido más general, se refiere al conocimiento acerca del desarrollo de ciertas tareas o actividades. En las sociedades desarrolladas, la ciencia y el conjunto de técnicas son los apoyos de la industrialización. En conjunto promueven una nueva forma para desarrollar el mundo.

Por lo tanto, si la tecnología es un conjunto de conocimientos aplicados al desarrollo, cuando hablamos de tecnología directiva, nos referimos al conjunto de conocimientos que

van a hacer que una organización se desarrolle y sea altamente competitiva. Una organización al dejar de incorporar conocimientos, tiende a volverse obsoleta, a perder participación de mercado, a generar pérdidas, y en general, en el corto plazo ser vulnerable y desplazada por los competidores.

De manera practica, la tecnología directiva toma la forma de prácticas como las de: Sistemas de Calidad, Reingeniería, Reducción de Costos, Justo a Tiempo, Planeación Estratégica, Equipo de trabajo de alto rendimiento; siendo así dispensable para que una organización continúe su desarrollo. Por ello, es muy importante a aprovechar en primer lugar los conocimientos y experiencia de sus colaboradores, documentándolos adecuadamente a través de Manuales de políticas y procedimientos.

Se puede pensar que hay muchas organizaciones que funcionan bien sin manuales, y esto es cierto porque cuentan con “expertos” en el campo de especialidad de la organización, y todo (o casi todo) dentro de la organización, a simple vista marcha sin problemas. Sin embargo, el problema es la alta dependencia que tiene la organización con estos expertos, ya que centralizan todas las decisiones; ellos son los más indicados para elaborar los manuales debido a sus conocimientos y experiencia.

Hay dos razones por las que los expertos pueden contribuir a la elaboración de manuales, la primera, tiene la oportunidad de dejar huella en su paso por la organización. y la segunda porque al entrenar a más personal, delega actividades rutinarias, dedicándose con sus amplios conocimientos a nuevos proyectos o a dar asesoría interna a la propia organización.

## **OBJETIVOS**

### **➤ OBJETIVO GENERAL:**

Elaborar un manual de procedimientos normalizados de trabajo para los análisis microbiológicos llevados a cabo en una empresa cosmética, con el fin de orientar al analista para su correcto proceder.

Documentar la NOM-089-SSA, 1-1994 para unificar criterios y cumplir con los requerimientos mínimos que exige la Secretaría de Salud, en cuanto a los límites microbianos de los productos de belleza

### **➤ OBJETIVO PARTICULAR:**

Establecer la estructura documental donde se señalen responsabilidades, decisiones e instrucciones de trabajo, elaborando procedimientos descriptivos y procedimientos específicos.

Describir, definir y documentar las actividades que se realizan en un laboratorio de microbiología de una empresa cosmética, para que las personas involucradas sean capaces de comprenderlos y ejecutarlos.



***SISTEMA  
DOCUMENTAL***

## CAPITULO 1 LOS MANUALES

### **1.1.-DEFINICION**

Un diccionario define la palabra “MANUAL” como un libro que contiene lo más sustancial de un tema, en este sentido, son vitales para incrementar y aprovechar el cúmulo de conocimientos y experiencias de personas y organizaciones.

Estos documentos son una de las herramientas más eficaces para transmitir conocimientos y experiencias, porque ellos certifican la tecnología acumulada hasta ese momento sobre un tema.

Así, encontramos manuales muy especializados en todos los campos de la ciencia y la tecnología. Encontramos que en la compra de cualquier computadora, televisión, estéreo, lavadora, refrigerador, equipo electrónico y maquinaria en general, se proporciona un manual de operación con el propósito de que el usuario, además de que lo disfrute al cien por ciento, pueda “aprender rápida y adecuadamente” a usarlo, manejarlo y mantenerlo, logrando así llegar a ser rápidamente “un experto”.

Dentro del ámbito de la industria, cada vez se descubre más la necesidad e importancia de tener y usar manuales, sobre todo, de políticas y procedimientos permitiéndole a una organización formalizar sus sistemas de trabajo y multiplicar la tecnología para consolidar su liderazgo y su posición competitiva.

### **1.2.-LOS MANUALES DE PROCEDIMIENTOS**

Estos documentos demuestran la tecnología que se utiliza dentro de un área, departamento, dirección, gerencia u organización. En este manual se deben contestar las preguntas qué y cómo se hace para administrar el área, departamento, dirección, gerencia u organización y para controlar los procesos asociados a la calidad del producto o servicio ofrecido (este control incluye desde la determinación de las necesidades del cliente hasta la entrega del producto o realización del servicio, evaluando el nivel de servicio post-venta).

En el caso de empresas pequeñas con un solo manual para toda la organización puede ser suficiente. Sin embargo, dado que la mayoría de las organizaciones tienen definidas las principales áreas del negocio (calidad, producción, ingeniería, proyectos, ventas, etc.) es conveniente por aspectos de control y facilidad del manejo de información que cada área tenga su propio manual de políticas y procedimientos. En el caso de que un área sea demasiado grande y maneje áreas o departamentos más pequeños, se podría decidir autorizar también a esas áreas o departamentos a tener sus propios escritos para asegurar consistencia en toda la organización, las únicas personas autorizadas para aprobar procedimientos son los responsables, directores o gerentes del primer nivel jerárquico.

Por supuesto, cada área solamente incluirá los procedimientos en que esté directamente relacionado. Es decir, cada área tendrá solamente aquellos documentos que por sus funciones maneje cotidianamente, sean estos procedimientos que su propia área haya generado o que estén relacionados con otras áreas. Cualquier persona de la organización que tenga deseos de colaborar, podrá hacerlo siempre y cuando se le dé un adecuado entrenamiento.

Los capítulos en que puede estar dividido el manual de procedimientos, están en función de las actividades y responsabilidades que se realice en el área que lo emita. Esto significa que a pesar de que en todas las áreas se tengan manuales de procedimientos, los contenidos de cada uno de ellos serán distintos. Aunque por supuesto, habrá procedimientos que estén repetidos debido a su alcance.

La elaboración de manuales de procedimientos implica en primer lugar definir las funciones y responsabilidades de cada una de las áreas que conforman la organización, incluso, en algunos casos lo primero que hay que hacer es definir las, agrupando o separando funciones según sea lo más conveniente, para hacer frente al mercado y cumplir con su misión.

Con la acelerada influencia que están teniendo la serie de las NORMAS ISO 9000, se puede también inicialmente elaborar el manual de calidad antes de arrancar con la elaboración de los manuales de procedimientos de las diferentes áreas. Al tener el manual de calidad, se tiene la guía de los veinte criterios de la NORMA ISO 9000 para dirigir el esfuerzo de elaboración de los diferentes Manuales de Procedimientos.

#### 1.2.1.- Contenido típico de los Manuales de procedimientos

El siguiente contenido es solamente una referencia de lo que podría incluir un manual de Procedimientos:

- Portada
- Índice
- I. Objetivos del manual
- II. Procedimientos
- III. Formatos
- IV. Anexos

## CAPITULO 2 LOS METODOS Y PROCEDIMIENTOS

### 2.1.-DEFINICIONES

Un PROCESO es el conjunto de elementos que interactúan para transformar insumos, en bienes o productos terminados, está formado por materiales, métodos y procedimientos, recursos humanos, maquinaria, equipo y el medio ambiente.

Un METODO es la guía detallada que muestra secuencial y ordenadamente como una persona realiza un trabajo. En algunos métodos, los pasos exactos, varían.

Un PROCEDIMIENTO es la guía detallada que muestra secuencial y ordenadamente como dos o más personas realizan un trabajo.

Todas las actividades que realiza el hombre están de manera natural regidas por métodos y procedimientos. Es a través de ellos que se documentan los conocimientos y experiencia de las generaciones anteriores.

Los métodos y procedimientos de uso cotidiano en las organizaciones, generalmente son verbales y no están por escrito. Incluso, la mayor parte de las veces la gente por falta de información y sensibilización acerca de su importancia, modifican y los desvirtúan de acuerdo al humor o presión de trabajo con que amanecen.

Los procedimientos que se usan dentro de una organización, generalmente son informales y los podemos observar fácilmente a través de las costumbres y hábitos de las personas, los que son escritos, además de asegurar la repetibilidad de un trabajo, permiten que el usuario siga tranquilamente por un camino seguro previamente probado. Además, al usarlo continuamente podrá estar capacitado para irlo mejorando.

### 2.2.- LA TÉCNICA DEL LIBRETO

Para facilitar el entendimiento y desarrollo de los procedimientos, se ha desarrollado una técnica a la que se le ha llamado “LA TÉCNICA DEL LIBRETO”, que consiste en presentar en secuencia “quien” hace “que” actividades. Para el desarrollo de métodos, ésta técnica es innecesaria, puesto que las actividades las realiza una sola persona y allí solamente hay que incluir el número consecutivo con la actividad que le corresponde y describir detalladamente la acción a realizar, esta técnica se compone de tres partes:

**Primera parte:** mencionar al actor (persona que va a realizar la (s) actividades (es). Se debe poner el puesto de la persona, no su nombre de pila. Por ejemplo, se debe decir, el inspector de control de calidad, el supervisor de línea, el encargado de área, etc.



**Segunda Parte:** Asignar un número consecutivo de la actividad a desarrollar por cada persona que va interactuando en el procedimiento.

**Tercera parte:** Describir la actividad que se realiza, iniciando siempre con un verbo de acción, indicando con la mayor precisión posible en cada actividad, los formatos, los métodos, las bitácoras, las consideraciones, los criterios, la información y las referencias que se van a utilizar para asegurar que dicha actividad sea realizada correctamente.

### **2.3.- EL MEJORAMIENTO DE LOS PROCEDIMIENTOS**

La forma de asegurar que los métodos y/o procedimientos se mejoren, es poniéndolos por escrito para así puedan ser usados, revisados, analizados, depurados y mejorados de una manera formal. Por política general, para los documentos controlados se ha establecido que toda la documentación sea formalmente revisada por lo menos una vez al año de su emisión o antes si hay algún cambio significativo en la organización. En algunos casos, algunas empresas dedican uno o dos días al año para revisar fuera de la compañía con todos los involucrados, sus correspondientes manuales.

Al principio, cuando empiezan a documentarse los procesos, sistemas, y actividades de la organización en manuales, esto parece una actividad tediosa y sin mayor trascendencia. Sin embargo, a través del tiempo, del uso real y del involucramiento del equipo directivo y sus brazos derechos, tanto los directivos como los colaboradores, reconocen el valor de toda la información, conocimientos y experiencia allí plasmados.

### CAPITULO 3 DOCUMENTACIÓN DEL SISTEMA DE CALIDAD

Para poder alcanzar niveles de calidad buenos y estables es necesario establecer una estructura documental donde se reflejen los métodos de trabajo de la empresa. El sistema documental consta dos grupos:

#### **3.1.- MANUALES DESCRIPTIVOS**

Son documentos que describen el método de trabajo de la empresa. Vendría a ser como un “*manual de instrucciones*”.

Los manuales descriptivos se estructuran en tres niveles:



#### **3.1.1.- NIVEL 1**

El primer nivel lo conforma un documento base donde se indican los principios que sigue la empresa con respecto a los procesos y elementos que influyen en la calidad de los servicios prestados. Se conoce como MANUAL DE CALIDAD, y se utiliza como carta de presentación de la filosofía y misión de la empresa a los clientes, posibles auditores externos, proveedores y personal interno. Al ser un documento de difusión, tiene un carácter público y puede repartirse a diferentes personas.

El manual de calidad es una declaración de principios y como tal tiene una relación directa con la estrategia de la empresa. Es por ello que la dirección debe intervenir en la redacción y aprovechar la oportunidad para replantearse si los objetivos y estrategias que se establecen para lograrlos están acordes con la capacidad y estructura de la empresa.

### 3.1.2.- NIVEL 2

Los documentos de segundo nivel son los procedimientos generales. Para cada uno de los puntos o procesos descritos en el manual de calidad que necesite ser ampliado se emite un procedimiento de general. Estos documentos describen cómo se llevan a cabo las actividades que conforman el punto o proceso, pero sin llegar a definir tareas concretas que no sean de interés general, son de carácter inter departamental y dan una visión global de todos los procesos de la empresa que tienen relación con el sistema de calidad, por lo que se definen desde que empieza el proceso hasta que acaba, con la entrega al cliente.

Este es uno de los puntos más difíciles de conseguir, porque a menudo el cliente no tiene una relación clara con el proceso, por parecer éste de carácter más interno. En estos casos pueden llegar a desconectarse la realización del proceso y el cliente.

Los procedimientos suelen tener una estructura determinada, que es invariable y que podría consistir en los siguientes apartados:

**Objetivo:** Descripción de objetivos que se pretende lograr.

**Alcance:** Define el campo o área de aplicación y en qué medida se aplica el procedimiento. Se menciona también, si procede, sus limitaciones de uso.

**Responsabilidades:** Delimita las responsabilidades para cada actividad descrita.

**Definiciones:** Aclara conceptos y expresiones que pudieran resultar ambiguos o de posible interpretación subjetiva. Se pueden realizar dos tipos de definiciones:

- Definiciones conceptuales: Cuando se quiere hacer cualquier comentario aclaratorio del procedimiento.
- Definiciones generales: Cuando se quiere especificar el significado de una palabra o abreviación.

**Ejecución:** Describe por orden cronológico la técnica operativa de las actividades necesarias para cumplir con los objetivos del procedimiento.

La descripción deberá contestar a las preguntas: ¿qué hacer?, ¿cómo hacerlo?, ¿cuándo hacerlo? y ¿quién lo hace?.

**Anexos:** Se relacionan y anexan los impresos, documentación, especificaciones, planos parciales o fragmentos de normas, diagramas de flujo, etc, que se utilicen para documentar el procedimiento.

**Registros:** Son los registros y formatos que se llenan al ejecutar el procedimiento; ¿dónde?, ¿cuándo?, ¿quien se encarga de ellos?.

### 3.1.3.- NIVEL 3

Fukuda, el precursor de la herramienta para la mejora continua conocida como CEDAC, realizó un estudio donde trataba de ver el impacto que tenía para la empresa el desconocimiento, por parte de los empleados, del método de ejecución de las tareas\*. Concluyó que la mayor fuente de no calidad no se encontraba, como en un principio parecería lógico, en la existencia de estándares de trabajo erróneos, sino que el desconocimiento de estos creaba muchos más problemas.

La falta de información, a todos los niveles, en referencia a ¿cómo? y ¿por qué? se realizan las tareas, puede crear un elevado número de errores y confusión. Redactando instrucciones de trabajo que expliquen con todo lujo de detalles cómo se lleva a cabo una tarea (PROCEDIMIENTOS ESPECIFICOS) y difundiendo entre los empleados ayuda a disminuir fallas.

La complejidad de los procedimientos específicos depende de a quien van dirigidos. Para tareas difíciles, de alta responsabilidad, podría aprovecharse la misma estructura del procedimiento general (NIVEL 2). En cambio, para tareas sencillas, es posible que redactar un procedimiento entero que no sea pesado e innecesario. Entonces deberá buscar alternativas para transmitir los mismos conocimientos de una forma más sencilla. Se suelen crear formatos donde los propios trabajadores en consenso puedan describir los pasos y parámetros que deben controlar para el correcto desarrollo de las tareas, de forma que les sirva de recordatorio y al mismo tiempo de difusión del método estándar.

### 3.2.-REGISTROS DE CALIDAD

Aquí se reúnen todos los formatos y registros que se utilizan durante la ejecución de los trabajos.

Durante la ejecución de los métodos de trabajo, descritos en los tres niveles de documentación antes comentados, se genera otro tipo de documentación probatoria de las actividades que se realizan, ya que, el sistema de calidad debe conseguir el aseguramiento de la calidad de los servicios.

Según la Norma ISO 8402-86, aseguramiento de la calidad es:

*“Conjunto de acciones planificadas y sistemáticas que son necesarias para proporcionar la confianza adecuada que un producto o servicio satisfará los requisitos dados sobre calidad”*

---

\* CEDAC: A tool for continuous improvement, FUKUDA.

En otras palabras: necesitamos comprobantes que certifiquen que se realiza lo que se dice en los procedimientos, o, dicho técnicamente, evidencias objetivas.

Si usted trabaja en ingeniería, un paso importante en la gestión de un proceso serán las reuniones de control sobre el estado del mismo. Esto se definirá en el procedimiento correspondiente, pero al mismo tiempo, cada vez que se realice una obra, deberá levantar un acta en un formato normalizado para que sirva de evidencia objetiva o comprobante.

Este formato podrá ser utilizado ante terceros para asegurar la calidad del procedimiento que se lleve a término. Por otro lado, también le sirve para tener una información completa de todo lo que pasa en los procesos y finalmente la empresa para poder emprender acciones de mejora a partir de las conclusiones que saque de su estudio.

**CRITERIOS PARA EL  
DESARROLLO DE UN  
PROGRAMA DE  
ASEGURAMIENTO DE CALIDAD  
EN UN LABORATORIO  
DE MICROBIOLOGIA  
COSMETICA**

## CAPITULO 4 IMPLEMETACIÓN DE UN PROGRAMA DE ASEGURAMIENTO DE CALIDAD EN UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA COSMETICA

### 4.1.- INTRODUCCIÓN

La primera acción es realizar un diagnóstico de la situación, en que se encuentra el laboratorio se realizara un informe detallado de las condiciones del laboratorio. A continuación, deben definirse perfectamente y acordarse las tareas analíticas del laboratorio, de forma que los objetivos del mismo sean perfectamente comprendidos.

Una vez que los procedimientos y objetivos han sido asumidos, la implementación comienza con la comprobación de que todos los elementos del programa de aseguramiento de la calidad están colocados en su lugar y que aquellos puntos débiles o que faltan son reforzados y entran a formar parte del sistema.

Se debe listar en orden lógico, los elementos que deben tenerse en cuenta. La secuencia de los mismos puede ser adaptada a cada situación particular e incluso puede establecerse cualquier otro orden de prioridad.

Con el fin de controlar el desarrollo de la operación, se debe establecer un cronograma e incluir todas las tareas que se deben llevar a cabo para alcanzar el objetivo final, a través de objetivos intermedios. Según la situación de partida, la implementación del programa puede requerir algunos meses o varios años.

Para cada tarea el coordinador debe escoger y preparar a un pequeño grupo o una sola persona para llevar a cabo esa misión particular. Esto evitará que los nuevos procedimientos vengán impuestos por la dirección sin contar con la participación del personal experimentado, quien será finalmente el responsable de la correcta aplicación de los procedimientos en el día a día.

### 4.2.- PERSONAL

La base del funcionamiento del sistema de aseguramiento de la calidad lo constituye un organigrama actualizado que recoja la organización del departamento. Una vez trazado y actualizado éste, se realizara una descripción completa y pormenorizada de las tareas asignadas a cada individuo de modo que la responsabilidad y la autoridad con respecto a todas las labores estén perfectamente destinadas.

Una vez que se conocen las tareas asignadas, es necesario comprobar si la formación del personal es adecuada al trabajo que éste debe efectuar. Esto podría llevar a una revisión de

currículo vitae; si se requiere este aspecto y dado que la formación requerirá tiempo, lo más adecuado es comenzar cuando antes con un plan de formación y/o capacitación.

Una vez definidas las tareas del departamento, tal vez sea necesario comprobar la infraestructura e instalaciones del laboratorio, con el fin de comprobar si cumplen los requisitos para los que han sido destinados.

Un aspecto importante que debe ser controlado son los requisitos de seguridad, ya que el manejo de agentes patógenos exige condiciones específicas.

#### **4.3.- MEDIOS DE CULTIVO**

La próxima fase es garantizar el aseguramiento de la calidad de los medios de cultivo preparados.

La composición de los medios de cultivo se debe describir de forma detallada. Tanto en el caso de medios de cultivo deshidratados como de sus componentes de origen comercial, la marca y referencia deben detallarse.

Para asegurar la calidad de los medios de cultivo deshidratados y sus componentes, los productores suelen efectuar sus propios controles de calidad, los resultados de éstos se recogen en certificados. Los laboratorios deben asegurarse que los lotes de medios de cultivo deshidratados o sus componentes se suministren con estos certificados de calidad, ya que éste no es un servicio rutinario. Adquirir grandes cantidades de un mismo lote de medio de cultivo puede ayudar al control de la calidad con un menor esfuerzo.

El procedimiento para la preparación de los medios de cultivo debe ser descrito con precisión, posteriormente se validará la esterilización y promoción de crecimiento.

El control de la calidad rutinario de medios de cultivo ya preparados suele ser considerado como superfluo dado que los lotes de medios de cultivo deshidratados se controlan en fábrica y el proceso de preparación también suele estar perfectamente controlado. Sin embargo, aunque no de forma exhaustiva, se recomienda la realización de un control antes de la utilización de un lote de medio de cultivo, el cual puede efectuarse mediante el método ecométrico (Mossel et. al., 1980) o cualquier otro procedimiento fiable de control de la calidad (IUMS, 1982).

El control de pH de los medios de cultivo preparados después de la esterilización es esencial, esta única comprobación podría ser suficiente, siempre y cuando el proceso de esterilización esté bajo control.

Durante la preparación de los medios de cultivo, se registrará el número de lote del polvo deshidratado y/o sus componentes, así como la fecha de preparación y el pH final después de la esterilización. Asimismo, se conservarán los datos del proceso de esterilización para cada lote de medio preparado.



Finalmente, se anotará para cada lote una fecha de caducidad basada en la fecha de preparación y las características del medio de cultivo y/o sus componentes.

La caducidad y las condiciones de conservación formarán parte de la documentación que acompañe a la preparación de los medios de cultivo.

#### 4.4.- **MÉTODOS**

Todos los métodos deben estar disponibles bajo forma de instrucciones escritas con un único formato y en la forma en la cual han de ser aplicados. En el caso en que se basen en normas, se debe especificar la referencia. Debido a que los métodos normalizados oficiales suelen ser excesivamente prolíficos, se puede hacer un resumen de ellos para su empleo en la poyata, este resumen contendrá los puntos clave mediante un diagrama de flujo acompañado de un breve texto explicativo.

La interpretación y lectura de las placas requiere una atención particular. Deben recogerse de forma explícita las normas del departamento y cuando se requiera una confirmación, se especificará la forma de realizarla según la práctica del laboratorio.

Deben establecerse los criterios mínimos de funcionamiento de un método de forma que nos permita la introducción de nuevos métodos de una forma controlada.

#### 4.5.- **EQUIPOS**

Todos los procedimientos para la calibración y uso de los equipos deben estar en orden, asimismo se especificará cada verificación que se deba efectuar antes de su empleo en el laboratorio.

Todos los equipos deben ser registrados con la indicación de la frecuencia de mantenimiento así como de las operaciones que comporta éste y el responsable de su realización.

Los equipos que se han averiado deben ser etiquetados como tales, sus reparaciones deben registrarse en el archivo correspondiente al equipo.

Los equipos críticos, como son aquellos que pueden influir directa o indirectamente en los resultados de los análisis en el caso de que no funcionen bien, deben ser calibrados de una forma regular. Se consideran equipos críticos las balanzas, los potenciómetros, el material volumétrico, los termómetros, las estufas, los baños de agua y las neveras. La frecuencia de la calibración también debe ser documentada.

Se registrará de forma específica la información relativa a la calibración, mantenimiento, fallas, acciones correctivas, etc., para todos los equipos.

#### 4.6.- TRATAMIENTO DE MUESTRAS

La toma de muestras comienza con unas buenas instrucciones para su realización, el desarrollo de un protocolo adecuado es la clave de la actividad. Asimismo, se deben definir y aplicar todos los requisitos para el transporte, almacenamiento y tratamiento de las muestras.

Cuando los procedimientos de toma de muestra se han escrito, puede ser útil verificar el proceso de toma de muestra real de forma que comprobemos que no se han establecido acciones poco realistas.

Cuando la toma de muestras se encuentre fuera del control del laboratorio, deben formularse reglas respecto al tratamiento de las muestras de origen desconocido, ya que no siempre es posible o necesario rechazar tales muestras, pero en el informe del laboratorio este aspecto debe ser establecido de forma que evitemos conclusiones injustificadas derivadas de las investigaciones analíticas.

#### 4.7.- TRATAMIENTO DE DATOS

Todos los procedimientos para la lectura, registro y tratamiento de datos microbiológicos, deben estar escritos. Es prioritario el diseño de una o más hojas de registro de datos, en las cuales se anoten los datos primarios. Una vez completada la hoja de registro y firmada por el analista, los resultados se transferirán al ordenador o a un formato de informe y entregarlo al cliente.

Los resultados de todos los controles de calidad aplicados en cada serie analítica deben tenerse en cuenta antes de la interpretación de los datos de una muestra en particular. El sistema que garantice esto debe formar parte de la organización del laboratorio.

#### 4.8.- SISTEMAS DE CONTROL DE LA CALIDAD

Cuando se establece un sistema de control de la calidad, se distinguen tres líneas (o niveles de control). En la primera línea, el control debe ser efectuado como un proceso de autocontrol por parte del técnico que realiza el trabajo de análisis y comprende, entre otras cosas:

- Control de la calidad de medios de cultivo preparados.
- Calibración de equipos críticos.
- Uso de muestra control (positivo, negativo)
- Uso de las muestras de referencia.

En la segunda línea, el control debe permitir la evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad intra-laboratorio y, consistirá entre otros, en el empleo de muestras duplicadas o cultivos con características conocidas.

En la tercera línea se encuentran los esquemas de evaluación externa de la calidad. Esta es la etapa concluyente del programa de aseguramiento de la calidad. Hoy en día el desarrollo de esquemas de evaluación externa de la calidad está obstaculizado por la falta de materiales de referencia, pero se están realizando grandes progresos y en breve se dispondrá de materiales de referencia adecuados para su uso cotidiano.

#### 4.9.- SEGUIMIENTO

Una vez completadas las etapas precedentes, ya se dispone de todo el material para el manual del laboratorio. Toda la documentación debe ser elaborada con el mismo formato y después ser sometida a un procedimiento interno de aceptación, de modo que el manual sea aprobado y su uso implantado.

A continuación debe realizarse una primera auditoría interna. Es necesario acordar e implantar un procedimiento formal de actualización del manual.

En este punto, el sistema mismo no será todavía perfecto y, según los objetivos del laboratorio, los procedimientos y las prácticas deberán ser revisadas y/o mejoradas cada dos años.



# **CONTROL MICROBIOLOGICO**

## CAPITULO 5 CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LOS COSMÉTICOS

### 5.1.- INTRODUCCIÓN

Aunque la legislación no impone actualmente normas de contaminación mínima, la pureza de los cosméticos, desde el punto de vista microbiológico, es en el presente una importante preocupación para la industria de dichos productos. Los fabricantes, en efecto, son cada vez más conscientes de los peligros y problemas asociados a la contaminación microbiana eventual de los preparados.

El control de calidad comienza antes de adquirir cualquier sustancia con la evaluación de proveedores, continua a lo largo de la fabricación, acondicionamiento y distribución, y no puede inspeccionarse dentro de un producto al final del su proceso. Los productos de elevada calidad microbiológica no se elaboran por casualidad se diseñan así desde las primeras fases de su producción.

Para evitar la contaminación, o por lo menos reducir la frecuencia, es importante, en primer lugar, conocer bien las posibles fuentes de microorganismos y trabajar en condiciones conforme a las buenas practicas de manufactura. La adición de un conservador antimicrobiano podrá permitir combatir las eventuales cargas microbianas importantes a condición de que la elección de dicho conservador se haya efectuado de manera juiciosa (teniendo en cuenta todos los factores susceptibles de modificar su actividad) y que su actividad “in situ” se haya controlado.

### 5.1.- ORIGEN DE LAS CONTAMINACIONES

Las posibles fuentes de contaminación microbiana de cosméticos son numerosas. A continuación se citan las más frecuentes:

#### 5.1.1.- Contaminaciones durante el proceso de fabricación

##### 1. LAS MATERIAS PRIMAS

Los ingredientes utilizados en las fórmulas del cosmético deben someterse a cuarentena hasta que se determine su calidad microbiológica; las que se encuentran aceptables deberán protegerse de la contaminación durante el almacenamiento.

Las materias primas son fuentes probables de contaminación microbiológica, y deben examinarse microbiológicamente como un principio de rutina.

Existen otras materias primas que deben ser estrechamente revisadas. Entre ellas cabe destacar:

- Productos biológicos de origen animal como extractos de tejidos o de órganos, proteínas y derivados, suero, plasma, etc.
- Productos de origen vegetal como polvos, extractos, jugos, resinas, gomas, agua florales, almidón, alginatos, pectinas...
- Productos de origen telúrico tales como bentonitas, bentonas, arcillas, kaolín y talco.
- Ciertos colorantes o pigmentos insolubles y agentes de superficie.

Para muchos de estos productos, el peligro es tan grande que pueden servir como sustrato a los microorganismos (productos de origen animal o vegetal, por ejemplo).

Para el examen microbiológico de las materias primas, existen varios métodos para la toma aséptica de muestras. El objeto es limitar la posibilidad de contaminación adicional al producto, de modo que los resultados del ensayo indiquen el estado microbiológico de la sustancia a su llegada a la planta. Una muestra se saca con cuchara o se pipetea del envase de la materia prima, se coloca en un envase de muestra esterilizado y se remite al laboratorio para el ensayo inmediato.

Se debe recordar que la excesiva humedad y las grandes fluctuaciones en la temperatura del ambiente pueden afectar las propiedades físicas, químicas y microbiológicas de las materias primas. Las materias primas que se retienen durante largos periodos de tiempo deben reensayarse a intervalos específicos, al menos cada seis meses que se adquieren preesterilizadas para garantizar la calidad microbiológica deben también analizarse para verificar, a) que el procedimiento de esterilización fue efectivo, y b) que no se produjo contaminación después de la esterilización.

## 2. ÁREAS DE ALMACENAMIENTO

Todas las materias primas deben almacenarse de tal modo que se mantenga el grado de pureza microbiológica analizado. Las áreas de almacenamiento para las materias primas deben mantenerse en un estado limpio.

Cuando es necesario almacenar materias primas, materiales de acondicionamiento, productos intermedios o productos terminados en medios especiales, estas existencias deben almacenarse aisladas del suelo cuando sea posible, en un estado limpio, seco y ordenado. Sin embargo esto no evita el almacenamiento exterior de materiales cuyo estado no afecte adversamente.

## 3. LOCALES Y MATERIAL

La contaminación de productos puede ser debida a la realización de ciertas operaciones en los locales o con material, ambos inadaptados o insuficientemente protegidos contra las causas de polución: corrientes de aire, humedad, agua, etc.

### 3a. Locales

Una condición previa para la buena higiene de los locales es evitar los dobles techos no estancos, las tuberías de fluidos aparentes y difíciles de atender, prever superficies como muros, suelos y bancos de trabajo, lisas, no absorbentes y fáciles de limpiar.

Pueden instituirse desinfecciones periódicas de los locales utilizando, por ejemplo formol gaseoso. Diversos aparatos automáticos homologados aseguran la emisión de formol bajo condiciones bien definidas de temperatura y humedad, por sublimación de trioximetileno.

### 3b. Material

El material utilizado debe estar concebido de forma que sea posible su perfecta limpieza y descontaminación. Se dará preferencia al acero inoxidable y se prestará una atención particular a la elección de la griferías y a la geometría de la tuberías (limitación en el número de codos, supresión de sifones..).

Después de su utilización, el material debe ser cuidadosamente limpiado con detergentes, descontaminado con germicidas y posteriormente lavado con agua caliente esterilizada.

## 4. EL PERSONAL

El personal de fabricación, de acondicionamiento y de mantenimiento, representa igualmente una fuente de contaminación que no puede ignorarse debido a que es portador de gérmenes, incluso en ausencia de toda patología infecciosa (piel, cabellos, saliva, vestidos, calzado,...) y a sus desplazamientos por los talleres de fabricación. Por tanto, dicho personal deberá ser informado de su posible papel como fuente de contaminación microbiana y de la necesidad de observar diversas medidas de higiene:

- Exclusión temporal de los equipos de fabricación y de acondicionamiento de toda persona afectada de infección cutánea.
- Necesidad de un lavado sistemático y eficaz de las manos eventualmente con un jabón antiséptico, al principio y en cada nueva incorporación al puesto de trabajo ( a la vuelta del aseo o de la pausa realizada para el almuerzo, etc.).
- Llevar vestimentas de trabajo limpias y bien cerradas, calzado de trabajo. La vestimenta de fibra sintética o mezcla de ésta y algodón son preferibles ya que desprenden menos fibras a la atmósfera.
- Llevar un gorro que cubra totalmente el cabello en determinadas ocasiones, máscara y/o guantes.
- Limitación de desplazamientos a los puestos de trabajo vecinos donde el producto esté en contacto con la atmósfera con el fin de limitar el
  
- número de partículas inevitablemente emitidas como consecuencia del movimiento de toda persona.

### 5.1.2.- Contaminaciones posteriores a la fabricación

#### 1. CONTAMINACIONES DEBIDAS AL ACONDICIONAMIENTO O ENVASE

La protección del producto, una vez que se ha llenado en un envase adecuado, depende fundamentalmente de la eficacia del cierre. Debe asegurarse el sellado y la hermeticidad, protegiendo así al producto de microbios durante un período indefinido. Esta protección puede describirse como criterio de conservación del producto.

Ciertos tipos de acondicionamiento están sujetos a contaminaciones tales como los recipientes provistos de tapones llevando consigo una junta móvil. El riesgo aumentará notablemente si dicha junta está constituida por una capa de cartón o un corcho recubierto por una película metálica o celulósica.

#### 2. CONTAMINACIONES DEBIDAS AL CONSUMIDOR

El consumidor, por sí mismo, puede contaminar el producto en el momento de su utilización. Ciertos envases favorecen este tipo de contaminación por entrada de aire en el momento de su manipulación (frascos con abertura ancha, tarros, tubos flexibles, bombas distribuidoras), o bien por entrada de agua en el momento de su utilización o cuando vuelven a cerrarse después de ésta (como es el caso de los champús o geles de ducha), o por favorecer factores de inoculación en el producto previamente manipulado, etc.). La juiciosa elección de un sistema de cierre y distribución del producto puede permitir disminuir este riesgo de contaminación por parte del usuario. Por otra parte, la conservación de los productos por el usuario a una temperatura frecuentemente elevada favorece la multiplicación de gérmenes previamente introducidos.

### 5.2.- NATURALEZA DE LOS CONTAMINANTES

Las bacterias son los agentes contaminantes más frecuentemente encontrados inmediatamente después de la fabricación de los productos. Los hongos inferiores (mohos y levaduras) son menos frecuentes. Las pseudomonas son las bacterias más frecuentemente aisladas en productos cosméticos no utilizados; esta frecuencia se explica por el origen hídrico de estos gérmenes. En segundo lugar se encuentran las entero bacterias, los estafilococos, micrococos y estreptococos, los bacillos clostridium, etc.

En curso de utilización, la naturaleza de los agentes contaminantes que se vuelven a encontrar no es idéntica: los estafilococos, son entonces los gérmenes más frecuentemente encontrados al igual que los mohos.



### **5.3.- CONSECUENCIAS DE LAS CONTAMINACIONES**

La contaminación microbiológica de un producto cosmético es perjudicial en un doble plano:

#### **5.3.1 EN EL PLANO DE LA SALUD, PARA EL CONSUMIDOR.**

En el terreno de la salud, para el consumidor, el riesgo será en función de la naturaleza del germen contaminante, de la importancia de la contaminación y de la zona corporal donde será depositado el producto. El riesgo más importante es si el producto se ha destinado para utilizarse sobre una piel lesionada o perjudicada, sobre todo en la vecindad de un mucosa (mucosa ocular, por ejemplo), o en niños pequeños, o en sujetos con baja resistencia a las infecciones, etc.

#### **5.3.2 EN EL TERRENO ECONÓMICO, PARA EL FABRICANTE.**

En el terreno económico, además de los costos debidos al rechazo de lotes contaminados, por parte del laboratorio de control, las modificaciones de los caracteres organolépticos y físico-químicos del producto, que aparecen frecuentemente cuando la contaminación es importante pueden influir negativamente al cliente a la hora de comprar ese producto.

**Las modificaciones que más frecuentemente se observan son:**

- Cambio de coloración debida, a la degradación de los componentes del producto, o a la formación de metabolitos difusibles por parte de los contaminantes (pigmentos de las pseudomonas por ejemplo) o a la aparición de colonias pigmentadas en la superficie de productos pastosos (flavobacterium, levaduras)
- Aparición de turbidez o floculaciones en productos líquidos, constituidas por la biomasa microbiana y/o por componentes del producto insolubilizado bajo la influencia del metabolismo microbiano.
- Aparición de gas (muy frecuentemente debido al desarrollo de bacterias anaerobias).
- Modificación de caracteres reológicos (variación de viscosidad o ruptura de emulsiones).
- Cambio olfativo: ciertos microorganismos producen compuestos de olor más o menos desagradables que van a modificar el perfume habitual del producto.
- Modificación del pH, oxidación, reducción, hidrólisis, etc., reacciones debidas a la acción de enzimas bacterianos.

# RESULTADOS

**PROCEDIMIENTOS  
NORMALIZADOS  
DE OPERACIÓN  
GENERALES**

## **LISTA DE PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE OPERACIÓN GENERALES**

- PNO-CM-00-35.** Procedimiento normalizado de operación general para los análisis microbiológicos.
- PNO-CM-00-36.** Procedimiento normalizado de operación general para la toma de muestra de granel, producto terminado y materia prima.
- PNO-CM-00-37.** Procedimiento normalizado de operación general para el uso y mantenimiento de equipos.
- PNO-CM-00-38.** Procedimiento normalizado de operación general para las especificaciones del material utilizado en el laboratorio de microbiología.
- PNO-CM-00-39.** Procedimiento normalizado de operación general para las especificaciones de los medios de cultivo.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN GENERAL  
PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-35

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 1 DE 6

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE	Responsable de Microbiología	Jefe de aseguramiento de Calidad	Director de Producción
FECHA			

**I N D I C E**

- 1.0 OBJETIVO
- 2.0 ALCANCE
- 3.0 REFERENCIAS
- 4.0 DEFINICIONES
- 5.0 RESPONSABILIDADES
- 6.0 DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO
- 7.0 DISTRIBUCIÓN DEL PROCEDIMIENTO
- 8.0 REGISTROS
- 9.0 ANEXOS

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
GENERAL PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

CÓDIGO  
PNO-CM-00-35

HOJA 2 DE 6

REGISTRO DE MODIFICACIONES Y CAMBIOS

REVISIÓN	FECHA	RESPONSABLE	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO
-----	-----	-----	-----

1.0 OBJETIVO

1.1 Describir la metodología para realizar el análisis microbiológico de granel, materia prima y producto terminado, determinando la aceptabilidad en cuanto se refiere a la carga microbiana en cumplimiento de una norma y especificaciones marcadas por el cliente.

2.0 ALCANCE

2.1 Aplica al laboratorio de microbiología del área de aseguramiento de calidad.

3.0 REFERENCIAS

3.1 Norma Oficial Mexicana NOM-089-SSA, 1-1994. BIENES Y SERVICIOS MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO MICROBIANO EN PRODUCTOS DE BELLEZA. Ver Anexo I.

3.2 Procedimiento estándar de operación de análisis microbiológico de muestras. Cosméticos y fragancias S.A. De C.V.

3.3 Guía de procedimientos del laboratorio de microbiología. Sally Beauty Company, INC.

4.0 DEFINICIONES

4.1 Aeróbico: microorganismo capaz de crecer en presencia de oxígeno libre.

4.2 Anaeróbico: microorganismo capaz de crecer en ausencia de oxígeno libre.

4.3 Aséptico: libre de microorganismo que son capaces de causar contaminación o enfermedad.

4.4 Bacterias: microorganismos unicelulares que derivan del reino vegetal, incluidos en el grupo de los Schycomysetes, su tamaño es variable y oscila entre 0.5-2um, algunos tienden a formar filamentos y pueden llegar a medir 30-40um. Por su forma se encuentran esféricas (cocos), bastones (bacilos) y espirales (vidrio), se reproducen por bipartición.

4.5 Contenido Microbiano: el número de microorganismos mesofílicos aerobios viables, hongos, levaduras y microorganismos objetables (patógenos) presentes en productos de belleza, que determina si el producto es apto para el uso humano.

4.6 Estéril: medio totalmente libre de microorganismos viables.

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
GENERAL PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

CÓDIGO

PNO-CM-00-35

HOJA 3 DE 6

- 4.7 Hongos: son organismos pertenecientes al reino fungi, que se caracterizan por tener un cuerpo formado por estructura filamentososa con ramificaciones, que se conocen con el nombre de hifas, al conjunto de hifas constituye el micelio, carecen de clorofila, se alimentan por absorción, pudiendo propagarse por esporas flageladas o no, las paredes celulares pueden ser de queratina, celulosa o manana, macro o microscópicas y su coeficiente de sedimentación del RNAm es de 25 s. Incluyen los Ordenes: Basidiomicetes, Ascomicetes, Deuteromicetes y Zygomycetes.
- 4.8 Levaduras: grupo de hongos cuya forma dominante de crecimiento es unicelular. Poseen un núcleo y se multiplica por reproducción sexual o asexual. La forma común de reproducción es asexual, por gemación o por fisión transversal. La reproducción sexual cuando ocurre, es por medio de ascosporas contenida en un saco o asca.
- 4.9 Medio: cualquier material líquido, sólido o semisólido, que soporta el crecimiento, de microorganismo.
- 4.10 Medio de Cultivo: se le denomina a las diferentes mezclas de sustancias nutritivas empleadas en el laboratorio para el cultivo de microorganismos.
- 4.11 Medios Diferenciales: son los que permiten distinguir entre las colonias de un organismo determinado y las de otro.
- 4.12 Medios Enriquecidos: son los que favorecen en general el desarrollo de los microorganismos de difícil crecimiento.
- 4.13 Medios Múltiples: son medios que tienen incluidas sustancias que nos permiten determinar una prueba bioquímica. Usualmente dichos medios contienen dos o más pruebas al mismo tiempo.
- 4.14 Medios selectivos: son medios sólidos que permiten el crecimiento de una clase de organismos, mientras que inhibe a otros.
- 4.15 Muestra: cantidad de piezas representativas del lote de materia prima, materiales, productos en proceso o productos terminados.
- 4.16 Organismos Coliformes: son bacilos Gram negativos, aerobios, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas dentro de 48 horas cuando se incuban a 32-35°C. Una variedad de bacterias muy abundantes y siempre presentes en la materia fecal del hombre y animales superiores; también pertenecen a ese grupo de ciertas bacterias propias del suelo y
- 4.17 Patógeno: un organismo que es capaz de causar enfermedad a un animal o planta.
- 5.0 RESPONSABILIDADES
- 5.1 Corresponde al jefe de aseguramiento de calidad conocer, capacitar y vigilar la aplicación del Procedimiento.
- 5.2 Es responsabilidad del personal del laboratorio de microbiología de cumplir estrictamente y sin ninguna desviación, el procedimiento de análisis microbiológico.

6.0 DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO

6.1 Departamento de Aseguramiento de Calidad

6.1.1 **Toma de Muestra**

Seleccionar una porción representativa de producto en proceso, producto terminado, materia prima y componentes, realizar la toma de muestra conforme al procedimiento **PNO-MC-00-36** para dicha acción.

6.1.2 **Recepción de Muestras**

Trasladar al laboratorio de microbiología las muestras obtenida y registrar su entrada en la bitácora de microbiología de materia prima ó bitácora de microbiología de granel y producto terminado.

6.2 Área de Microbiología

**Químico en microbiología**

6.2.1 En condiciones asépticas y bajo la protección de una campana de flujo laminar, realizar el método de **Enriquecimiento PNO-CM-00-01** a todas las muestras recibidas; si los tubos después de su incubación presentan turbidez y/o mal olor llevar a cabo una resiembra en agar soya tripticaseína usando el método de dilución (**PNO-CM-00-03**), incubar durante 18-24 horas a 31-35°C; efectuar una tinción de Gram (**PNO-CM-00-06**) en caso de haber desarrollo microbiano. Si los tubos no presentan turbidez y/o mal olor reportar como negativo y ausencia de microorganismos patógenos.

Para los productos que son aplicados en el área de ojos, realizar una resiembra en agar soya tripticaseína usando el método de dilución, aunque no presenten turbidez y/o mal olor.

6.2.2 Determinar la **cuenta total de mesofilos aerobios, hongos y levaduras** siguiendo el **PNO-CM-00-02** realizar los análisis en condiciones de esterilidad como lo indica el **PNO-CM-00-18**, Si las placas de cuenta total presentan un crecimiento microbiano, llevar a cabo un recuento de colonias, el resultado se multiplica por el inverso de la dilución que es 10/1, remitirse a la tabla de aceptación y/o rechazo verificar si esta dentro de los límites aceptables. Efectuar una tinción de Gram a las colonias encontradas observar su morfología microscópica ver **PNO-CM-00-22**.

6.2.3 Confirmar o descartar la presencia de patógenos de todas las muestras que tuvieron desarrollo microbiano en el método de Enriquecimiento y/o Cuenta total, después de haber observado su morfología microscópica en las tinciones de Gram. Se procede como sigue:

6.2.3.1 **Bacilos Gram positivos:** Reportar como ausencia de patógenos.

6.2.3.2 **Cocos Gram positivos:** Resembrar por el Método de extensión en medio agar Voghel-Johnson o agar sales manitol incubar a 30-35°C por 48 horas. Si el desarrollo es típico de *Staphylococcus aureus* (según la tabla 1) , realizar las pruebas de coagulasa (**PNO-CM-00-08**) y catalasa (**PNO-CM-00-07**) si son positivas identificar con el sistema API Sthap ver **PNO-CM-00-10**.

6.2.3.3 **Bacilos Gram negativos:** Resembrar por extensión en los medios de agar EMB y agar Mac Conkey, para identificación de *Escherichia Coli* y agar cetrimida para *Pseudomona aeruginosa* incubar durante 18-24 horas a 33 o 42°C. Si hay presencia de colonias sospechosas conforme a la Tabla 1, realizar la identificación con los sistemas de identificación API 20E y API 20NE. Ver **PNO-CM-00-11** y **PNO-CM-00-12**.



6.2.4 En caso de que en los medios EMB o AMC se encuentren colonias sospechosas de salmonella conforme a la Tabla 1, realizar una resiembra en el medio caldo cistina-selenito y caldo tetracionato, incubar durante 12-24 horas a 37°C o 43°C. Si en cualquiera de los dos medios de enriquecimiento se presenta turbidez o mal olor, tomar una azada y aislar por espiral en los medios agar verde brillante, agar XLD y agar sulfito de bismuto, observar la morfología colonial y compararlas con las descritas en la Tabla 1 si son características de salmonella, realizar una identificación con los sistemas API.

### 6.3 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

6.3.1 Si todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación se aprueba el producto.

6.3.2 Si alguno de los resultados no cumple con los criterios de aceptación, se reanalizará para confirmar el resultado obtenido. Si el resultado es similar al análisis inicial, dando resultados que no cumplen con especificaciones el producto se rechaza y se envía a destrucción. Si el resultado da niveles satisfactorios, sin la presencia de microorganismos patógenos el producto se aprueba.

6.3.3 Si los resultados no llegan al límite de rechazo, pero rebasan los niveles marcados como aceptables, se cuarentenan al producto y realizar una investigación para establecer el origen de la contaminación. Revisar el historial del producto y su tendencia en los resultados microbiológicos del producto, identificar al microorganismo encontrado.

6.3.4 Si después de realizar la investigación se encuentra que el historial del producto es aceptable ( no hay antecedentes de resultados microbiológicos similares al encontrado) y además los niveles de contaminación disminuyen a niveles no detectables de cuenta microbiana ( menos de 10 UFC/g), el producto se aprueba.

### 6.4 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

6.4.1 Productos para el área de los ojos

Mesófilos Aerobios	Menos de 50 UFC/g	APROBADO
	51 a 100 UFC/g	REANALISIS
	Mayor a 500 UFC/g	RECHAZADO
Hongos y/o Levaduras	Menor a 10 UFC/g	APROBADO
	11 a 50 UFC/g	REANALISIS
	Mayor a 50 UFC/g	RECHAZADO
Microorganismos Patógenos	<i>Escherichia coli</i>	Ausencia
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia
	<i>Staphilococcus aureus</i>	Ausencia
	<i>Salmonella thypi</i>	Ausencia

## 6.4.2 Productos para labios, mejillas y faciales

Mesófilos Aerobios	Menos de 100 UFC/g 101 a 1000 UFC/g Mayor a 1000 UFC/g	APROBADO REANALISIS RECHAZADO
Hongos y/o Levaduras	Menor a 50 UFC/g 51 a 100 UFC/g Mayor a 100 UFC/g	APROBADO REANALISIS RECHAZADO
Microorganismos Patógenos	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Salmonella thypi</i>	Ausencia Ausencia Ausencia Ausencia

7.0 DISTRIBUCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

- 7.1 Jefe de aseguramiento de calidad  
7.2 Responsable y personal del área de microbiología

8.0 REGISTROS

- 8.1 Bitácora de microbiología de producto terminado y granel.  
8.2 Bitácora de microbiología de materia prima.

9.0 ANEXOS

- 9.1 ANEXO I: Norma Oficial Mexicana NOM-089-SSA1-1994. Bienes y servicios. Métodos para la determinación del contenido microbiano en productos de belleza.  
9.2 ANEXO II: Diagrama de flujo  
9.3 ANEXO III: Formato de la bitácora de microbiología

**ANEXO I**

**NOM-089-SSA1-1994.NORMA OFICIAL  
MEXICANA , BIENES Y SERVICIOS.  
METODOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL  
CONTENIDO MICROBIANO EN PRODUCTOS  
DE BELLEZA.**

Fuente : Diario Oficial de la Federación

NOM-089-SSA1-1994

**NORMA OFICIAL MEXICANA, BIENES Y SERVICIOS. METODOS PARA LA DETERMINACION DEL CONTENIDO MICROBIANO EN PRODUCTOS DE BELLEZA.**

JOSE MELJEM MOCTEZUMA, Director General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, por acuerdo del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 38 fracción II, 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 3o. fracción XXII, 13, 194 fracción I, 197, 401-Bis-1 y 401-Bis-2 de la Ley General de Salud; 2o. fracción III, 40, 41, 1236, 1237, 1244 y 1245 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios; 8o. fracción IV y 13 fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud, y

**CONSIDERANDO**

Que con fecha 23 de marzo de 1994, en cumplimiento de lo previsto en el artículo 46 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización la Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios presentó al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, el anteproyecto de la presente Norma Oficial Mexicana.

Que con fecha 4 de agosto de 1994, en cumplimiento del acuerdo del Comité y de lo previsto en el artículo 47 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó en el Diario Oficial de la Federación el proyecto de la presente Norma Oficial Mexicana a efecto que dentro de los siguientes noventa días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentaran sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario.

Que en fecha previa fueron publicadas en el Diario Oficial de la Federación las respuesta a los comentarios recibidos por el mencionado Comité, en términos del artículo 47 fracción III de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

Que en atención a las anteriores consideraciones, contando con la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, se expide la siguiente:

**NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-089-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. METODOS PARA LA DETERMINACION DEL CONTENIDO MICROBIANO EN PRODUCTOS DE BELLEZA.**

**PREFACIO**

En la elaboración de la presente norma participaron los siguientes organismos e instituciones:  
**SECRETARÍA DE SALUD.**

Laboratorio Nacional de Salud Pública.

Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.**

Facultad de Química.

**AVON COSMETICS, S. A. DE C.V.**

**BEIERSDORF DE MEXICO, S. A. DE C.V.**

**CLAIROL DE MEXICO, S. A. DE C.V.**

**GILLETTE DE MEXICO, S. A. DE C.V.**

**YVES ROCHER DE MEXICO, S. A. DE C.V.**

**INDICE**

0. INTRODUCCION
1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION
2. FUNDAMENTO
3. DEFINICIONES
4. SIMBOLOS Y ABREVIATURAS
5. DISPOSICIONES SANITARIAS
6. REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO
7. MATERIAL Y EQUIPO
8. CUENTA TOTAL DE HONGOS, LEVADURAS Y MESOFILICOS AEROBIOS
9. IDENTIFICACION DE PATOGENOS
10. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
11. BIBLIOGRAFIA

## 12. OBSERVANCIA DE LA NORMA

## 13. VIGENCIA

**0. Introducción**

Las disposiciones de la presente Norma Oficial Mexicana son de orden público e interés social y establece los métodos para la determinación del contenido microbiano en productos de belleza, para asegurar que están libres de contaminación y son aptos para uso humano, de acuerdo con lo establecido por la Ley General de Salud, su Reglamento y demás disposiciones aplicables de la Secretaría de Salud.

**1. Objetivo y campo de aplicación**

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece los métodos de prueba para determinar el contenido microbiano en productos de belleza, con el fin de conocer la calidad sanitaria y precisar si son aptos para uso humano.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el territorio nacional para las personas físicas o morales que requieran efectuar estos métodos.

**2. Fundamento**

Colocar una cantidad determinada de cosméticos o productos de belleza en medios de cultivo apropiados para poner de manifiesto la contaminación microbiana por bacterias, hongos y levaduras; después de su incubación realizar la cuenta del desarrollo e identificar los microorganismos potencialmente patógenos.

**3. Definiciones**

Para fines de esta norma se entiende por:

3.1 Aeróbico, microorganismo capaz de crecer en presencia de oxígeno libre.

3.2 Anaeróbico, microorganismo capaz de crecer en ausencia de oxígeno libre.

3.3 Aséptico, libre de microorganismos que son capaces de causar contaminación o enfermedad.

3.4 Bacterias, microorganismos unicelulares que derivan del reino vegetal, incluidos en el grupo de los Schycomysetes, su tamaño es variable y oscila entre 0,5-2  $\mu$ , algunos tienden a formar filamentos y pueden llegar a medir 30-40  $\mu$ . Por su forma se encuentran esféricas (cocos), bastones (bacilos) y espirales (vibrio), se reproducen por bipartición.

3.5 Contenido microbiano, el número de microorganismos mesófilos aerobios viables, hongos, levaduras y microorganismos objetables (patógenos) presentes en productos de belleza, que determina si el producto es apto para el uso humano.

3.6 Estéril, medio totalmente libre de microorganismos viables.

3.7 Hongos, son organismos pertenecientes al reino Fungi, que se caracterizan por tener un cuerpo formado por estructura filamentososa con ramificaciones, que se conocen con el nombre de hifas, el conjunto de hifas constituye el micelio, carecen de clorofila, se alimentan por absorción, pudiendo propagarse por esporas flageladas o no, las paredes celulares pueden ser de queratina, celulosa o manana, macro o microscópicas y su coeficiente de sedimentación del RNAm es de 25 s.

Incluyen los Ordenes: Basidiomicetes, Ascomicetes, Deuteromicetes y Zygomycetes.

3.8 Levaduras, grupo de hongos cuya forma dominante de crecimiento es unicelular. Poseen un núcleo y se multiplican por reproducción sexual o asexual. La forma común de reproducción es asexual, por gemación o por fisión transversal. La reproducción sexual cuando ocurre, es por medio de ascosporas contenida en un saco o asca.

3.9 Medio, cualquier material líquido, sólido o semisólido, que soporta el crecimiento de microorganismos.

Se le denomina medio de cultivo a las diferentes mezclas de sustancias nutritivas empleadas en el laboratorio para el cultivo de microorganismos.

3.10 Medios diferenciales, son los que permiten distinguir entre las colonias de un organismo determinado y las de otro.

3.11 Medios enriquecidos, son los que favorecen en general el desarrollo de los microorganismos.

3.12 Medios múltiples, son medios que tienen incluidas sustancias que nos permiten determinar una prueba bioquímica. Usualmente dichos medios contienen dos o más pruebas al mismo tiempo.

3.13 Medios selectivos, son medios sólidos que permiten el crecimiento de una clase de organismos, mientras que inhibe el de otros.

3.14 Organismos coliformes, son bacilos gram negativos, aerobios, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas dentro de 48 horas cuando se incuban a 32-35°C. Una variedad de bacterias, muy abundantes y siempre presentes en la materia fecal del hombre y animales superiores; también pertenecen a ese grupo ciertas bacterias propias del suelo y vegetales.

3.15 Patógeno, un organismo que es capaz de causar enfermedad a un animal o planta.

#### 4. Símbolos y abreviaturas

Cuando en esta norma se haga referencia a los siguientes símbolos y abreviaturas se entiende por:

UFC	Unidad formadora de colonias
lb	libras
g	gramos
ml	mililitros
$\mu$	micras
$^{\circ}\text{C}$	grados Celsius
p/v	peso sobre volumen
v/v	volumen sobre volumen
c.b.p.	cuanto basta para
Q.P.	químicamente puro
UV	ultravioleta
HCl	ácido clorhídrico
DNA	ácido desoxirribonucleico
$\text{H}_2\text{S}$	ácido sulfhídrico
EMB	agar eosina azul de metileno
AEM	agar extracto de malta
LIA	agar hierro y lisina
TSI	agar hierro y triple azúcar
ALM	agar Letthen modificado
AMC	agar MacConkey
PDA	agar papa dextrosa
AVJ	agar Vogel Johnson
CDS	caldo dextrosa Sabouraud
BHI	caldo infusión de cerebro corazón
CLM	caldo Letthen modificado
MIO	medio indol omitina
MR-VP	medio rojo de metilo Voges Proskauer
No.	número

Cuando en la presente norma se mencione al Reglamento, debe entenderse que se trata del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.

#### 5. Disposiciones sanitarias

5.1 Los productos en los cuales se aplicarán los métodos objeto de esta norma, se encuentran establecidos en el Reglamento.

5.2 Los fabricantes podrán efectuar métodos diferentes a los incluidos en esta norma, para el control interno de sus productos; pero para efectos de comprobación de resultados por acciones de verificación sanitaria, se deben ajustar a los métodos de la presente norma.

#### 6. Reactivos y medios de cultivo

Los reactivos empleados en esta prueba deben ser grado analítico a menos que se indique otra cosa. Cuando se hable de agua debe entenderse agua destilada.

##### 6.1 Reactivos

Aceite mineral  
 Acetona  
 Acido acético 5 N  
 Acido clorhídrico  
 Acido oxálico  
 Acido sulfanílico  
 Acido tartárico  
 Alcohol amílico o butílico  
 Alfa naftilamino  
 Amoníaco concentrado  
 Cloruro de sodio  
 Cristal violeta

Diclorhidrato de N-N-dimetil p-fenilendiamina  
Etanol absoluto  
Fosfato monobásico de potasio  
Hidróxido de potasio  
Hidróxido de sodio al 10%  
1-Naftol  
Oxalato de amonio  
Para dimetilamino benzaldehído  
Peróxido de hidrógeno  
Plasma de conejo o cobayo  
Rojo de metilo  
Safranina O  
Sulfato de cobre  
Telurito de potasio  
Tween 80  
Yodo  
Yoduro de potasio  
Zinc en polvo  
6.2 Medios de cultivo  
Agar cetrinida  
Agar citrato de Simmons  
Agar DNA azul-toluidina  
Agar eosina azul de metileno  
Agar extracto de malta  
Agar hierro y lisina  
Agar hierro y triple azúcar  
Agar Letthen modificado  
Agar MacConkey  
Agar pseudomona F  
Agar pseudomona P  
Agar papa dextrosa  
Agar sal-manitol  
Agar sulfito de bismuto  
Agar verde brillante  
Agar Vogel-Johnson  
Agar xilosa lisina desoxicolato (agar XLD)  
Base de caldo tetrionato  
Caldo cistina selenito  
Caldo Dextrosa Sabouraud  
Caldo infusión de cerebro corazón  
Caldo Letthen modificado  
Caldo lisina descarboxilasa  
Caldo urea  
Medio basal O/F (oxidativo-fermentativo)  
Medio indol omitina  
Medio indol nitrito  
Medio rojo de metilo Voges Proskauer  
Medio SIM  
Tiras API para pruebas bioquímicas  
6.3 Preparación de reactivos y medios de cultivo  
6.3.1 Reactivos  
6.3.1.1 Solución salina al 0,85%  
Cloruro de sodio 8,5 g  
Agua c. b. p. 1 000,0 ml

Disolver el cloruro de sodio en 500 ml de agua, aforar a 1 000 ml, ajustar el pH a  $7,2 \pm 0,1$  filtrar, envasar y esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

**6.3.1.2 Solución de etanol 80% y HCl al 1% v/v**

Etanol 8	0,0 ml
HCl	1,0 ml
Agua c.b.p.	100,0 ml

Mezclar el etanol y el HCl, aforar a 100 ml con agua y envasar.

**6.3.1.3 Solución de tween 80%**

Tween 80% sin diluir

Envasar y esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

**6.3.1.4 Aceite mineral**

Envasar y esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

**6.3.1.5 Solución de Acido Tartárico al 10% p/v**

Acido Tartárico	10,0 g
Agua c.b.p.	100,0 ml

Disolver el ácido tartárico en 50 ml de agua, aforar a 100 ml, envasar y esterilizar por filtración por membrana.

**6.3.1.6 Solución de telurito de potasio al 1% p/v**

Telurito de potasio	1,0 g
Agua c.b.p.	100,0 ml

Disolver el telurito en 50 ml de agua, aforar a 100 ml, envasar y esterilizar por filtración por membrana.

**6.3.1.7 Solución de yodo-yoduro de potasio p/v**

Yodo	6,0 g
Yoduro de potasio	5,0 g
Agua	20,0 ml

Disolver el yoduro de potasio en el agua y en esta solución disolver el yodo. Conservar en envases protegidos de la luz.

**6.3.1.8 Solución de agua oxigenada al 3% v/v**

Peróxido de Hidrógeno	3,0 ml
Agua c.b.p.	100,0 ml

Mezclar el peróxido en agua, aforar a 100 ml y envasar.

**6.3.1.9 Solución indicadora rojo de metilo**

Rojo de metilo	0,1 g
Alcohol al 95%	300,0 ml
Agua c.b.p.	500,0 ml

Mezclar el rojo de metilo en el alcohol y diluir con agua a 500 ml.

**6.3.1.10 Reactivo de Griess-Ilosvays**

Solución A

Acido sulfanílico	8,0 g
Acido acético 5N	1 000,0 ml

El ácido acético 5N se prepara agregándole un volumen de ácido acético glacial a 2,5 volúmenes de agua. Mezcle bien, añada luego el ácido sulfanílico y vuelva a mezclar.

Solución B

Alfa naftilamina	8,0 g
Acido acético 5N 1	000,0 ml

Mezclar y almacenar en refrigeración ( $4^{\circ}\text{C}$ ) cuando no esté en uso. Generalmente ambos reactivos son estables aproximadamente durante 3 meses.

**6.3.1.11 Reactivo de Kovacs y Ehrlich**

Para-dimetil-amino-benzaldehído	5,0 g
Alcohol amílico o butílico 7	5,0 ml
Acido clorhídrico (37%) Q.P.	25,0 ml

Disuelva el para-dimetil-amino-benzaldehído en el alcohol. Caliente suavemente la solución en un baño de agua tibia. Una vez disueltos los ingredientes, agregue el ácido clorhídrico con cuidado.



**6.3.1.12 Reactivo de O'Meora**

Hidróxido de potasio 40	0 g
Agua 100	0 ml

Disolver y enfriar. Añadir 0,3 g de creatinina (monohidrato) La solución reactiva, lista para el uso, puede conservarse en refrigeración (+4°C) durante 4 semanas aproximadamente.

**6.3.1.13 Solución de sulfato de cobre según Leifson**

Sulfato de cobre	1,0 g
Amoniaco concentrado	40,0 ml
Solución de sosa potásica al 10%	690,0 ml

Disolver el sulfato de cobre con amoniaco concentrado y añadir hidróxido de potasio al 10% que ha sido preparada con hidróxido de potasio.

**6.3.1.14 Reactivo de Barrit**

1-naftol A	5,0 g
Alcohol absoluto	100,0 ml

Disolver el 1-naftol en el alcohol y envasar.

**6.3.1.15 Solución de cristal violeta**

Cristal violeta	0,010 g
Acido acético glacial	10,0 ml

Disolver el cristal violeta en el ácido acético y envasar.

**6.3.1.16 Solución yodo-yodurada**

Yoduro de potasio	2,0 g
Yodo	1,0 g
Agua	100,0 ml

Triturar en un mortero el yodo y el yoduro de potasio, adicionar el agua necesaria para que se disuelva el yodo, agregar agua hasta un volumen de 100 ml. Conservar protegido de la luz.

**6.3.1.17 Solución safranina**

Safranina "O"	2,5 g
Alcohol etílico al 95%	100,0 ml

Disolver la safranina "O" en el alcohol etílico. Tomar 10 ml de esta solución y llevar a 100 ml con agua. Agitar.

**6.3.1.18 Solución alcohol-acetona**

Partes iguales de acetona y alcohol etílico al 95%.

**6.3.2 Medios de cultivo**

Los medios de cultivo pueden prepararse a partir de medios comerciales deshidratados, o con los ingredientes que se especifican a continuación.

**6.3.2.1 Medios nutritivos o de enriquecimiento**

**6.3.2.1.1 Agar Lethen modificado**

Agar Lethen	32,0 g
Peptona de caseína	5,0 g
Peptona de carne	10,0 g
Extracto de levadura	2,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Bisulfito de sodio	0,1 g
Agar	5,0 g
Agua	1 000,0 ml

pH final después de esterilizar  $7,2 \pm 0,2$

Mezclar los componentes y calentar con agitación hasta la disolución completa del agar. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

**6.3.2.1.2 Caldo Lethen modificado**

Caldo Lethen	26,7 g
Peptona de caseína	5,0 g
Peptona de carne	10,0 g
Extracto de levadura	2,0 g
Bisulfito de sodio	0,1 g
Agua	1 000,0 ml

pH final después de esterilizar  $7,2 \pm 0,2$

Mezclar los componentes hasta la disolución completa y distribuir 95 ml en botellas con tapón de rosca para dilución. Esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

**6.3.2.1.3 Agar papa dextrosa**

Infusión de papa	200,0 ml
Dextrosa	20,0 g
Agar	15,0 g
Agua	1 000,0 ml

pH final  $5,6 \pm 0,2$

Suspender los ingredientes en un litro de agua agitando, remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Esterilizar a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Antes de usarse se licua, se enfría a  $45-50^{\circ}\text{C}$ , se ajusta el pH a 3,5 con una solución de ácido tartárico al 10%.

**6.3.2.1.4 Base de caldo tetracionato**

Mezcla de peptonas	5,0 g
Mezcla de sales biliares	1,0 g
Carbonato de calcio	10,0 g
Tiosulfato de sodio	30,0 g
Agua	1 000,0 ml

pH final  $7,0 \pm 0,1$

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua. Mezclar bien y calentar a ebullición. Dejar enfriar y envasar en tubos de ensayo estériles, en volúmenes de 10 ml cada uno.

Guardar en refrigeración. No esterilizar en autoclave. Momentos antes de usarlo agregar 0,2 ml (de 3 a 4 gotas) de la solución yodo-yoduro de potasio (6.3.1.7) a cada tubo. Usar el medio el mismo día en que se le agrega la solución de yodo.

**6.3.2.1.5 Caldo Dextrosa Sabouraud**

Polipeptona o neopeptona	10,0 g
Dextrosa	40,0 g
Agua	1 000,0 ml

pH después de esterilizar  $5,6 \pm 0,2$

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua. Remojar de 10 a 15 minutos. Mezclar bien hasta obtener una suspensión uniforme. Calentar agitando frecuentemente durante un minuto. Distribuir y esterilizar a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. No sobrecalentar, ya que por su alto contenido en carbohidratos se oscurece y pierde eficacia.

**6.3.2.2 Medios selectivos y diferenciales.**

**6.3.2.2.1 Agar MacConkey**

Digerido pancreático de gelatina	17,0 g
Digerido pancreático de caseína	1,5 g
Digerido péptico de tejido animal	1,5 g
Lactosa	10,0 g
Mezcla de sales biliares	1,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agar	13,5 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal Violeta	0,001 g
Agua	1 000,0 ml

pH después de esterilizar  $7,1 \pm 0,2$

Suspender el medio deshidratado en 1 000 ml de agua, remojar de 10 a 15 minutos y calentar a ebullición agitando continuamente. Hervir durante un minuto, esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Enfría a  $45-50^{\circ}\text{C}$  y vaciar en cajas Petri unos 20 ml por placa. Dejar solidificar y luego invertir las cajas para evitar que se deposite un exceso de humedad en la superficie del medio.

**6.3.2.2.2 Agar Vogel Johnson**

Digerido pancreático de caseína	10,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Manitol	10,0 g
Fosfato dibásico de potasio	5,0 g

Cloruro de litio	5,0 g
Glicina	10,0 g
Agar	16,0 g
Rojo de fenol	0,025 g
Agua	1 000,0 ml

pH después de esterilizar  $7,2 \pm 0,2$

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua, mezclar, dejar remojar de 5 a 10 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Distribuir y esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Enfriar el medio entre  $45$  y  $50^{\circ}\text{C}$  y adicionar 20 ml de una solución estéril al 1 % de telurito de potasio. Agitar vigorosamente y distribuir unos 20 ml en cajas de Petri.

**6.3.2.2.3 Agar de sal y manitol**

Digerido pancreático de caseína	5,0 g
Digerido péptico de tejido animal	5,0 g
Extracto de carne	1,0 g
D-manitol	10,0 g
Cloruro de sodio	75,0 g
Agar	15,0 g
Rojo de fenol	0,025 g
Agua	1 000,0 ml

pH después de esterilizar  $7,4 \pm 0,2$

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua y remojar 15 minutos. Mezclar y calentar a ebullición durante un minuto. Esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Distribuir porciones de 20 ml en cajas Petri de  $15 \times 100$  mm.

**6.3.2.2.4 Agar Cetrimida**

Digerido pancreático de gelatina	20,0 g
Cloruro de magnesio	1,4 g
Sulfato de potasio	10,0 g
Agar	13,6 g
Cetil bromuro de trimetil amonio (cetrimida)	0,3 g
Glicerol	10,0 ml
Agua	1 000,0 ml

pH después de esterilizar  $7,2 \pm 0,2$

Disolver en agua los componentes sólidos antes de adicionar el glicerol. Remojar unos 10 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir un minuto. Distribuir y esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

**6.3.2.2.5 Agar eosina azul de metileno**

Digerido pancreático de gelatina	10,0 g
Fosfato dibásico de potasio	2,0 g
Agar	15,0 g
Lactosa	10,0 g
Eosina "Y"	0,4 g
Azul de metileno (Metiltionina)	0,065 g
Agua	1 000,0 ml

pH después de esterilizar  $7,1 \pm 0,2$

Disolver el digerido pancreático de gelatina, el fosfato dibásico de potasio y el agar en el agua. Esterilizar, dejar enfriar y antes de utilizar, agregar las siguientes soluciones a cada 100 ml de agar líquido: 5 ml de solución 1:5 de lactosa, 2 ml de solución 1:50 de eosina "Y" y 2 ml de solución 1:300 de azul de metileno. Mezclar.

**6.3.2.2.6 Agar extracto de malta**

Extracto de malta	30,0 g
Agar	20,0 g
Agua	1 000,0 ml

pH después de esterilizar  $5,5 \pm 0,2$

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua, homogeneizar y remojar de 10 a 15 minutos, calentar agitando frecuentemente, hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Si el medio se

sobrecalienta el agar perderá su capacidad de gelificarse. Enfriar de 47-50°C y ajustar el pH a 3,5 con una solución de ácido tartárico al 10% estéril.

**6.3.2.2.7 Caldo infusión de cerebro corazón**

Infusión de cerebro de ternera	200,0 g
Infusión de corazón de res	250,0 g
Peptona de gelatina	10,0 g
Dextrosa	2,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Fosfato disódico	2,5 g
Agua	1 000,0 ml

pH final 7,4 ± 0,2

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua y calentar ligeramente si es necesario. Se puede agregar 0,1% de agar si se desea. Envasar y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

**6.3.2.2.8 Agar verde brillante.**

Extracto de levadura	3,0 g
Mezcla de peptonas	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Lactosa	10,0 g
Sacarosa	10,0 g
Rojo de fenol	0,08 g
Agar	20,0 g
Verde brillante	0,125 g
Agua	1 000,0 ml

pH final 6,9 ± 0,2

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua y dejar remojar unos 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos, dejar enfriar a 45-50°C y distribuir en cajas de Petri estériles.

**6.3.2.2.9 Agar xilosa lisina desoxicolato (agar XLD)**

Xilosa	3,5 g
L-Lisina	5,0 g
Lactosa	7,5 g
Sacarosa	7,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Rojo de fenol	0,08 g
Agar	13,5 g
Desoxicolato de sodio	2,5 g
Tiosulfato de sodio	6,8 g
Citrato de hierro y amonio	0,8 g
Agua	1 000,0 ml

pH final 7,4 ± 0,2

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua y dejar que se remoje de 10 a 15 minutos. Calentar con todo cuidado y agitando con frecuencia justamente hasta que el medio hierva. No sobrecalentar. Transfiera al baño de agua, dejar enfriar a 50°C y verter en cajas de Petri. El medio debe ser transparente y color rojo rubí anaranjado. El calentamiento excesivo o el mantener demasiado tiempo en baño de agua, puede ocasionar que se formen precipitados. En este caso se corre el riesgo de que las colonias sean de menor tamaño y presenten reacciones menos nítidas. Sin embargo el precipitado no perjudica el desarrollo bacteriano y puede eliminarse por filtración con papel filtro.

**6.3.2.2.10 Agar Pseudomona F**

Peptona de caseína	10,0 g
Peptona de carne	10,0 g
Sulfato de magnesio	1,5 g
Hidrogenofosfato dipotásico	1,5 g
Agar-agar	12,0 g
Glicerina	10,0 ml

Agua 1 000,0 ml

pH después de esterilizar  $7,2 \pm 0,2$

Disolver en agua los componentes sólidos, adicionar la glicerina. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave 15 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$ . Dejar solidificar los tubos en posición inclinada o bien verter en placas.

#### 6.3.2.2.11 Agar Pseudomona P

Peptona de gelatina	20,0 g
Cloruro de magnesio	1,4 g
Sulfato potásico	10,0 g
Agar-agar	12,6 g
Glicerina	10,0 ml
Agua	1 000,0 ml

pH después de esterilizar  $7,2 \pm 0,2$

Disolver en agua los componentes sólidos, adicionar la glicerina. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave 15 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$ . Dejar solidificar los tubos en posición inclinada o bien verter en placas.

#### 6.3.2.2.12 Caldo Cistina Selenito

Mezcla de peptonas	5,0 g
Lactosa	4,0 g
Fosfato de sodio	10,0 g
Selenito ácido de sodio	4,0 g
Cistina	0,01 g
Agua	1 000,0 ml

pH final  $7,0 \pm 0,2$

Suspender 23 g del polvo en un litro de agua desionizada. Mezclar bien y calentar ligeramente hasta que el medio se disuelva. Envasar en tubos de ensaye, preferiblemente con tapas de rosca, volúmenes entre 10 y 15 ml por tubo. Esterilizar a vapor fluente durante 15 minutos. No en autoclave. No sobrecalentar. El medio así preparado y herméticamente tapado, puede conservarse en buenas condiciones, hasta 3 meses en refrigeración.

#### 6.3.2.2.13 Agar Sulfito y Bismuto

Mezcla de peptonas	10,0 g
Extracto de carne	5,0 g
Dextrosa	5,0 g
Fosfato disódico	4,0 g
Sulfato ferroso	0,3 g
Indicador de sulfito de bismuto	8,0 g
Verde brillante	0,025 g
Agar	20,0 g
Agua	1 000,0 ml

pH final  $7,5 \pm 0,2$

Suspender el polvo en un litro de agua, mezclar bien y remojar el medio deshidratado de 10 a 15 minutos para obtener un buen gel. Hervir no más de un minuto agitando continuamente para que se disuelva completamente el agar.

Dejar que el medio se enfríe a  $45^{\circ}\text{C}$  y sin dejar de agitarlo vacíe en cajas de Petri no menos de 20 ml de medio fluido. Las placas deben permanecer parcialmente descubiertas hasta que se seque la superficie del medio y usarlos el mismo día. Evite el sobrecalentamiento.

### 6.3.3 Medios para pruebas bioquímicas

#### 6.3.3.1 Medio Basal O/F (de Hugh y Leifson)

Peptona Caseína	2,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Fosfato dipotásico	0,3 g
Azul bromotímol	0,03 g
Agar	2,5 g
Agua	1 000,0 ml

pH final  $7,1 \pm 0,2$

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua, remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando con frecuencia, hasta disolver el agar. Agregar 10 ml de solución de glucosa al 10% esterilizada por filtración (o del azúcar apropiado)

por cada 100 ml del medio fluido, mezclar y distribuir asepticamente 5 ml en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar en autoclave a 118°C durante 10 minutos a fin de evitar la degradación del azúcar. El medio tiene un color verde.

**6.3.3.2 Medio Indol Ornitina (MIO)**

Extracto de levadura	3,0 g
Peptona	10,0 g
Triptona	10,0 g
L-ornitina	5,0 g
Dextrosa	1,0 g
Agar	2,0 g
Bromocresol púrpura	0,02 g
Agua	1 000,0 ml

pH final 6,5 ± 0,2

Disolver el medio deshidratado en un litro de agua, remojar unos 5 minutos, calentar a ebullición. Distribuir porciones de 4 ml en tubos de 10 x 100 mm y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

**6.3.3.3 Medio Indol Nitrito**

(Medio de trip-caseína y nitrato)

Peptona de caseína	20,0 g
Fosfato disódico	2,0 g
Dextrosa	1,0 g
Nitrato de potasio	1,0 g
Agar	1,0 g
Agua	1 000,0 ml

pH final 7,2 ± 0,2

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua. Agregar 2 g de agar en el caso de hacerse movilidad y detección de gas. Calentar agitando continuamente y hervir durante más o menos un minuto hasta disolución total del medio. Envasar en tubos de ensayo hasta la mitad de su altura y esterilizar en autoclave durante 15 minutos. Si se prepara el medio semisólido, dejar que se solidifiquen los tubos en posición vertical.

**6.3.3.4 Medio Rojo de Metilo Voges Proskauer**

Peptona especial No. 1	7,0 g
Dextrosa	5,0 g
Fosfato dipotásico	5,0 g
Agua	1 000,0 ml

pH final 6,9 ± 0,2

Disolver el medio deshidratado en un litro de agua, mezclar bien, si es necesario calentar un poco hasta disolución total. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

**6.3.3.5 Agar Citrato de Simmons**

Fosfato dehidrogenado de amonio	1,0 g
Fosfato dipotásico	1,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Citrato de sodio	2,0 g
Sulfato de magnesio	0,2 g
Agar	15,0 g
Azul bromotimol	0,06 g
Agua	1 000,0 ml

pH final 6,9 ± 0,2

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua, dejar remojar durante 5 a 10 minutos. Mezclar bien y calentar agitando frecuentemente hasta ebullición y completa disolución. Distribuir volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Los tubos se dejan enfriar en posición inclinada de manera que el medio de cultivo en el fondo del tubo alcance una profundidad de 1 a 1,5 cm. Se puede emplear también como medio en placas.

**6.3.3.6 Caldo urea**

Urea	20,0 g
Fosfato monopotásico	9,1 g
Fosfato de sodio	9,5 g
Extracto de levadura	0,1 g

Rojo de fenol	0,01 g
Agua	1 000,0 ml

pH final 6,8 ± 0,2

Disolver 38,61 g en 1 000 ml de agua, calentando en caso necesario a 60°C como máximo. Esterilizar por filtración o tras distribución a razón de 3 ml por tubo; o bien esterilizar con cuidado en marmita de vapor durante 5 minutos. No esterilizar en autoclave.

**6.3.3.7 Agar lisina hierro**

Peptona de gelatina	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Dextrosa	1,0 g
L-lisina	10,0 g
Citrato férrico-amónico	0,5 g
Trisulfato de sodio (anhidro)	0,04 g
Púrpura de bromocresol	0,02 g
Agar	15,0 g
Agua	1 000,0 ml

pH final 6,7 ± 0,2

Suspender el medio deshidratado, remojar unos 15 minutos, calentar para disolver los ingredientes agitando con frecuencia y hervir durante un minuto o hasta disolución completa. Distribuir en porciones de 4 ml en tubos con tapón de rosca de 13 x 100 mm. Esterilizar en autoclave 12 minutos a 121°C. Dejar solidificar en posición inclinada a tener 4 cm de un extremo y 2,5 cm sesgado. Cerrar con cuidado las tapas a fin de evitar pérdidas de agua por evaporación.

**6.3.3.8 Agar de hierro y triple azúcar.**

Mezcla de peptonas 2	0,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Lactosa	10,0 g
Sacarosa	10,0 g
Dextrosa	1,0 g
Sulfato de amonio férrico	0,2 g
Rojo fenol	0,025 g
Agar	13,0 g
Tiosulfato de sodio	0,2 g
Agua	1 000,0 ml

pH final 7,3 ± 0,2

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua, remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta ebullición y completa disolución. Distribuir en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar a 118°C durante 15 minutos. Los tubos se deben enfriar en posición inclinada de manera que el medio de cultivo en el fondo del tubo alcance una profundidad de 1,5 a 2,0 cm.

**6.3.3.9 Agar DNA azul toluidina**

Ácido desoxirribonucleico (DNA)	0,3 g
Agar	10,0 g
Cloruro de calcio (anhidro)	0,0011 g
Cloruro de sodio	10,0 g
Azul O toluidina	0,083 g
Tris (hidroximetil) aminometano	6,1 g
Agua	1 000,0 ml

Disolver el Tris (hidroximetil) aminometano en un litro de agua. Ajustar el pH a 9,0, adicionar los demás ingredientes excepto el azul O toluidina y calentar a ebullición para su disolución. Añadir al medio el color azul O toluidina. Distribuir en cajas Petri o portaobjetos.

**6.3.3.10 Caldo de lisina y descarboxilasa**

Peptona de gelatina	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Dextrosa	1,0 g
L-Lisina	5,0 g
Púrpura de bromocresol	10,02 g

Agua 1 000,0 ml

pH final 6,8 ± 0,2

Disolver el medio deshidratado en un litro de agua. Distribuir en porciones de 5 ml en tubos con tapón de rosca. La tapa debe de estar algo floja para permitir un buen intercambio de gases. Apretarla bien al terminar la esterilización. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

#### 6.3.3.11 Medio SIM

Peptona de caseína 20,0 g

Peptona de carne 6,1 g

Sulfato de hierro y amonio 0,2 g

Tiosulfato de sodio 0,2 g

Agar 3,5 g

Agua 1000,0 ml

pH final 7,3 ± 0,2

Suspender el medio deshidratado en un litro de agua, agitando frecuentemente. Remojar durante 10 minutos y hervir a ebullición durante un minuto. Distribuir en tubos de ensayo a una altura de unos 4 cm y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

## 7. Material y equipo

### 7.1 Material

Matraces Erlenmeyer de 2000, 1000, 500, 200 y 100 ml

Pipetas serológicas en 1/10 de 1, 2, 5, 10 y 25 ml

Vasos de precipitados de 80 y 500 ml

Probetas de 100, 500 y 1000 ml

Embudos de vidrio

Cajas de Petri 20 X 100 mm y 15 x 100 mm

Pipetas Pasteur

Tubos de ensayo 16 X 150 mm

Botellas de 100 ml para dilución con tapón de rosca

Botellas de dilución de leche de 250 ml

Codos de vidrio

Termómetros graduación de -10 a 200°C

Portaobjetos

Papel parafilm

Marcador

Masking tape

Gasa y algodón

Bolsas estériles de polietileno

Membrana de 0,45 µ

Porta filtro

### 7.2 Equipo

Estufa a 35 ± 2°C

Estufa a 30 ± 1°C

Refrigerador

Balanzas analítica y granataria

Potenciómetro

Autoclave

Horno para esterilizar

Recipiente para material contaminado

Espátulas

Microespátulas

Microscopio

Baño maría

Cuenta colonias

Asa y porta asa

Pinzas y tijeras



Esterilizar el material y equipo en autoclave (a 121°C durante 15 minutos) u horno (170-180°C durante 2 horas), según sea conveniente.

7.2.1 Cepas de referencia

Candida albicans (ATCC 10231)

Aspergillus niger (ATCC 16404)

Staphylococcus aureus (ATCC 6538)

Escherichia coli (ATCC 11105, 10536)

Salmonella typhi (LNA 99)

Pseudomona aeruginosa (ATCC 15442, 25619)

**8. Cuenta total de hongos, levaduras y mesofílicos aerobios**

8.1 Toma de muestra (del producto)

8.1.1 Analizar la muestra tan pronto como sea posible. Si es necesario almacenar, debe hacerse a la temperatura ambiente.

8.1.2 No incube, refrigere o congele las muestras antes o después de su análisis.

8.1.3 Inspeccione las muestras cuidadosamente antes de abrirlas y anote cualquier irregularidad del contenedor de dichas muestras.

8.1.4 Desinfecte la superficie del contenedor con un algodón estéril impregnado con cualquiera de los siguientes desinfectantes:

Solución de etanol al 70% (v/v) y ácido clorhídrico 1% (v/v) (alcohol ácido).

Solución de etanol al 70% con 4% de yodo

Solución de glutaraldehído al 2%

Benzal al 0,001%

8.1.5 Antes de abrir y tomar la muestra o contenido; secar la superficie con gasa estéril.

8.1.6 Homogeneizar el producto al tomar la muestra necesaria de acuerdo a su estado físico. Para líquidos, agitar el contenido del envase; para semisólidos y polvos, mezclar el contenido con una espátula estéril; para sólidos, raspar el producto con espátula estéril y tomar una muestra representativa; y para aerosoles, después de limpiar asépticamente el recipiente, expeler apropiadamente la cantidad de producto brevia agitación.

8.2 Preparación preliminar de las muestras

8.2.1 Para las muestras que sean miscibles en CLM y CDS, adicionar 1 g o ml en 90 ml de CLM y 1 g o ml en 90 ml de CDS en condiciones asépticas.

8.2.2 Para las muestras que no sean miscibles en CLM y CDS (ejemplo, cremas, labiales, etc.), en 2 frascos estériles o bolsas de polietileno estériles debidamente etiquetados; uno para CLM y otro para CDS, adicionar 1 g o 1 ml de la muestra y agregar 0,5 ml de tween 80 estéril a cada uno de los frascos o bolsas previamente marcados y homogeneizar la muestra.

8.2.3 En caso de usar los frascos poner en baño maria a 45°C hasta formar una emulsión homogénea (el tiempo de exposición en el baño no debe exceder de 15 minutos).

8.2.4 Posteriormente agregar a cada uno de los frascos o bolsas 90 ml de CLM y 90 ml de CDS respectivamente y agitar perfectamente.

8.3 Procedimiento

8.3.1 Incubar a 30°C ± 2 durante 7 días los medios de cultivo inoculados. Marcar los frascos o bolsas que se enturbien al agregar la muestra.

8.3.2 Confirmar si existe crecimiento a los 2 y 7 días de incubación.

8.3.3 Cuando el crecimiento sea evidente o se tenga duda de desarrollo microbiano, hacer una resiembra en ALM y AEM, inoculando 0,5 ml de cultivo del CLM y CDS respectivamente, empleando el método de vaciado en placa o de dispersión con codos de vidrio esterilizado.

8.3.4 Incubar durante 4 días a 30°C ± 2.

8.4 Interpretación de resultados

Observar si hay crecimiento en los medios inoculados:

Si no hay crecimiento reportar: menos de 10 UFC/ml o g de muestra. Concluyendo el ensayo.

Si se presenta crecimiento, continuar con la prueba definitiva que se describe a continuación.

8.5 Cuenta total de mesofílicos aerobios, hongos y levaduras.

8.5.1 Procedimiento

Agregar por separado 10 ml o g de muestra a 90 ml de medio CDS y CLM (Dilución 10-1) cuando las muestras sean miscibles en éstos.

Para las muestras que no son miscibles; en dos frascos o bolsas estériles debidamente etiquetados: uno para CLM y otro para CDS, adicionar 10 g o ml de muestra y colocar 5 ml de tween 80 estéril a cada uno de los frascos o bolsas previamente marcados. En caso de usar los frascos poner en baño de agua a 45°C hasta formar una emulsión homogénea (el tiempo de exposición en el baño de agua no debe exceder de 15 minutos).

Posteriormente agregar a cada uno de los frascos o bolsas 85 ml de CLM y 85 ml de CDS respectivamente y agitar perfectamente. (Dilución 10-1)

A partir de la dilución 10-1, realizar diluciones seriadas según el crecimiento esperado de la siguiente manera:

TUBO	DILUCION	VOLUMEN AGREGADO	CLM o CDS (ml)
1	10-2 o 1:100	1 ml de dilución 10-1	9
2	10-3 o 1:1000	1 ml de dilución 10-2	9
3	10-4 o 1:10 000	1 ml de dilución 10-3	9
4	etc.		

Para la cuenta estándar total, realizar las diluciones en CLM; y para la cuenta de hongos y levaduras, realizar las diluciones utilizando el CDS. Mezclar hasta homogeneizar. Colocar 1 ml de cada dilución en cajas de Petri estériles previamente marcadas con la dilución, registro y fecha, agregar de 18 a 20 ml de medio de cultivo cuidando que la temperatura no sea mayor de 45°C; para cuenta estándar total, utilizar ALM; y para cuenta de hongos y levaduras, emplear AEM o PDA. Homogeneizar el inóculo en el medio de cultivo, rotando la caja sembrada de izquierda a derecha, vertical y horizontalmente 6 veces en cada ocasión. Dejar solidificar el medio de cultivo en las cajas. Si se emplea el método de dispersión con codos de vidrio, utilizar 0,5 ml de inóculo por cada dilución y colocarlo en cajas de Petri conteniendo ALM y AEM para cuenta estándar total y cuenta de hongos y levaduras respectivamente. Dispersar el inóculo con codos de vidrio estériles. Dejar que se absorba el inóculo. Invertir las cajas e incubar: a 30°C ± 2 durante 48 horas para la cuenta estándar total; a 22°C durante 5 días para la cuenta de hongos y a 35°C por 48 horas para la cuenta de levaduras.

#### 8.5.2 Interpretación de resultados

##### 8.5.2.1 Cuenta total de hongos y levaduras

Contar el número de hongos y levaduras que se encuentren.

Reportar el número de colonias /ml o g de muestra multiplicando por el inverso de la dilución observada.

En el caso de utilizar el método por dispersión de codo de vidrio, el resultado se multiplicará por 2. Concluyendo la prueba.

##### 8.5.2.2 Cuenta total de mesofílicos aerobios

Contar las cajas en donde se encuentren de 25 a 250 UFC.

Reportar el número de UFC/ml o g de muestra multiplicando por el inverso de la dilución observada. En el caso de utilizar el método por dispersión con codo de vidrio, el resultado obtenido se multiplicará por 2.

Para identificación de microorganismos patógenos se continuará con el punto siguiente.

### 9. Identificación de patógenos

#### 9.1 Procedimiento

Incubar los tubos de la dilución 1:100 o 1:1000 de CLM utilizados para la cuenta estándar total, durante 7 días a 30°C ± 2. A partir de los tubos inoculados sembrar una azada en los siguientes medios de cultivo diferenciales: agar cetrimida, EMB, AMC y AVJ. Incubar de 33 a 37°C durante 24 horas los medios de EMB y AMC, y 48 horas el agar cetrimida y AVJ.

Observar las cajas inoculadas para búsqueda de *E. coli*,

*S. Typhi*, *S. aureus* y *Ps. sp.* en los medios respectivos (ver Tabla 1).

Tabla No. 1

MEDIO DE CULTIVO	MICROORGANISMO	CARACTERÍSTICAS COLONIALES
Agar eosina azul de metileno	E. coli	Colonias pequeñas azul negro en la parte central con brillo metálico verdoso a la luz reflejada
	Salmonella	Transparentes, color ámbar
	Staphylococcus coagulasa (+)	Colonias incoloras, en punta de alfiler
Agar MacConkey	Salmonella, Shigella y otros	Incoloros, transparentes
	E. coli	Grandes, rojas, que pueden estar rodeadas de una zona de precipitación de bilis
	Enterobacter, Klebsiella	Grandes, rosadas, mucosas
	Entrococos, Staphylococcus y otros	Diminutas, de crecimiento aislado, opacas
Agar cetrimida	Ps. sp.	Colonias grandes blancas o verdes cremosas
	E. coli	Crece poco, sin pigmento
	S. aureus	No crece
Agar Vogel Johnson	S. aureus	Colonias pequeñas, negras, con halo amarillo.
	S. epidermidis y otros	Pequeñas, negro-grisáceas, sin halo
	E. coli	No crece
	Ps. aeruginosa	No crece

### 9.2 Tinción de Gram

Si se observan colonias sospechosas de los microorganismos antes mencionados, de acuerdo a la Tabla No. 1, realizar una tinción de Gram para identificar morfología microscópica.

#### 9.2.1 Procedimiento

Preparar un frotis con microorganismos provenientes de un cultivo de 24-48 horas de incubación. Aplicar calor suave al portaobjetos con la llama de un mechero o de una lámpara de alcohol de manera paulatina. El calentamiento no debe ser excesivo ni violento. Enfriar y aplicar sobre el frotis unas gotas de solución de cristal violeta, dejar actuar un minuto. Lavar con agua y escurrir. Aplicar unas gotas de la solución yodo-yodurada con mordente, dejar actuar un minuto. Lavar con agua y escurrir. Decolorar el frotis con unas gotas de la solución alcohol-acetona, durante no más de 10 segundos. Lavar con agua y escurrir. Aplicar unas gotas de la solución de safranina, dejar actuar entre 15 y 30 segundos. Lavar con agua, inclinar el portaobjeto para dejar escurrir el exceso de agua y secar los bordes con papel secante.

#### 9.2.2 Interpretación de resultados

Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

Las bacterias Gram positivas, se observan teñidas de color azul violáceo intenso.

Las Gram negativas se observan de color rojo.

### 9.3 Identificación de S. aureus

En caso de encontrar cocos en racimo Gram positivos, continuar con las siguientes pruebas para búsqueda de S. aureus.

#### 9.3.1 Prueba de catalasa

Aislar la colonia sospechosa en ALM, incubar a 33-37°C durante 18-24 horas. Si se observa crecimiento, realizar la prueba de catalasa como se indica a continuación: en un portaobjetos adicionar una gota de solución de agua oxigenada al 3% y dispersar una porción de la colonia sospechosa. La reacción es positiva si se observan burbujas efervescentes del oxígeno desprendido, utilizar controles positivos y negativos.

Aislar en agar de sal y manitol o AVJ, incubando a 33-37°C durante 24-48 horas. Observar si hay colonias fermentadoras de manitol. Resembrar en medio de oxidación-fermentación con dextrosa, incubar a 33-37°C durante 18-24 horas, y observar si hay desarrollo microbiano.

Sembrar las colonias sospechosas en dos tubos con BH1, uno destinado para la técnica de coagulasa y otro para la técnica de termonucleasa, incubar a 35°C de 18-24 horas.

Reportar de acuerdo a la Tabla No. 2

9.3.2 Prueba de coagulasa

9.3.2.1 Procedimiento (método 1)

Con la ayuda de una asa, transferir individualmente las colonias sospechosas de las cajas en que se desarrollaron de cualquiera de los dos medios de cultivo, de agar sal y manitol o AVJ para estafilococo, a tubos individuales que contengan 0,5 ml de plasma de conejo o de cobayo. Incubar en baño maría a 35°C durante una hora, observar a las 3 horas y después a distintos intervalos hasta las 24 horas.

Reportar positiva la prueba si hay formación de coágulo pequeño pero bien constituido o una coagulación total de la mezcla.

Correr en paralelo el mismo procedimiento con el testigo, éste debe dar la prueba positiva.

9.3.2.2 Procedimiento (método 2)

Adicionar a cada tubo 0,5 ml de BHI. Transferir cada colonia sospechosa de las cajas en las que se desarrollaron al caldo con ayuda de una asa. Hacer lo mismo con el control positivo. Incubar 24 horas a 35°C. Posteriormente adicionar a cada tubo 0,5 ml de plasma. Incubar 3 horas en baño de agua, entre 35-37°C sin movimiento.

9.3.2.3 Interpretación de resultados

La presencia de un coágulo dará la prueba positiva, de lo contrario se procederá a continuar la incubación hasta 24 horas.

Si al transcurrir el tiempo no se observa coágulo, la prueba se considera negativa.

NOTA: No todos los tipos de *S. aureus* son coagulasa positiva.

9.3.3 Prueba de la termonucleasa

Al otro tubo sembrado en BHI, practicar la prueba de la termonucleasa, corriendo dicha prueba con un control positivo.

9.3.3.1 Procedimiento (método 1)

En una caja de Petri desechable con 10 ml de medio de cultivo, agar DNA azul toluidina, se efectúan orificios de 2 mm de diámetro.

Calentar en baño maría durante 15 minutos el cultivo de *Staphylococcus aureus* seleccionado.

Colocar una gota del cultivo obtenido en alguno de los orificios e identificarlo, incubar a 37°C durante 24 horas.

9.3.3.2 Procedimiento (método 2)

Inactivar el cultivo en baño maría durante 15 minutos. En un portaobjetos con agar DNA azul toluidina, aplicar en oradaciones de 2 mm de diámetro (previamente realizadas) la muestra y el control positivo. Incubar durante 24 horas de 35-37°C.

9.3.3.3 Interpretación de resultados

Transcurrido el tiempo de incubación, observar vire del agar de morado a violeta o rosa y la presencia de halo.

Se da como positiva la prueba con la presencia de un halo color rosa alrededor de los orificios que indican hidrólisis del DNA.

Reportar: *Staphylococcus aureus* termonucleasa positiva.

Tabla No. 2

CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE <i>S. aureus</i>			
DETERMINACION	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>Micrococcus sp.</i>
Prueba de catalasa	+	-	-
Fermentación de manitol	+	-	-
Crecimiento en O/F	fermentativo		
Prueba de Coagulasa	+	-	-
Prueba de Termonucleasa	+		
Vogel Proskauer	+		-
Oxidasa	-		-
Reducción de nitratos	+		d

d= variable

9.4 Pruebas bioquímicas empleadas

9.4.1 Prueba de oxidasa

La prueba de oxidasa se realiza de la siguiente manera: impregnar una tira de papel filtro en diclorohidrato de N-N dimetil p-fenilendiamina y sobre ella colocar una porción de la colonia sospechosa. La prueba es positiva si se produce un color que va de rosa a púrpura.

#### 9.4.2 Prueba en TSI

Sembrar el cultivo puro sometido a ensayo tanto por estría en la superficie inclinada como en la columna vertical, mediante estría central. Incubar 48 horas a 37°C.

##### 9.4.2.1 Interpretación de resultados

- A = Viraje a rojo por formación de álcali.
- OA = Sin alteración del color original del medio de cultivo o rojo por formación de álcali.
- S = Viraje a amarillo, por formación de ácido.
- SG = Viraje a amarillo y formación de gas.
- + = Ennegrecimiento por formación de H<sub>2</sub>S.
- = Ausencia de ennegrecimiento.

#### 9.4.3 Prueba en LIA

Sembrar el cultivo puro sometido a ensayo, tanto por estría sobre la superficie inclinada como por picadura central en la columna vertical subyacente. Incubar de 16-18 horas a 37°C.

##### 9.4.3.1 Interpretación de resultados

- Violeta = Viraje del indicador de pH púrpura de bromocresol por la descarboxilación de lisina y la consecuente alcalinidad.
- Amarillo = Fermentación de glucosa con la consecuente acidez del medio.
- Negro = Formación de coloración negra por el H<sub>2</sub>S y producción de sulfato de hierro.

#### 9.4.4 Prueba en medio basal O/F (de Hugh y Leifson)

A partir del cultivo puro sometido a ensayo, que se encuentre lo más posible en la fase logarítmica de multiplicación, sembrar por el procedimiento de picadura hasta el fondo, un tubo con recubrimiento de parafina y otro tubo sin tal recubrimiento para cada carbohidrato elegido. Incubar 48 horas como mínimo a la temperatura de 35°C.

##### 9.4.4.1 Interpretación de resultados

- Amarillo en ambos tubos = Fermentación del correspondiente carbohidrato.
- Amarillo en tubo no recubierto = Degradación oxidativa del carbohidrato. Oxidación en la superficie.
- Movilidad = Si la turbidez se extiende en la totalidad del medio.

Gas = Observar formación de gas.

#### 9.4.5 Prueba en agar citrato de Simmons

Sembrar el cultivo puro por estría, en la superficie del medio de cultivo e incubar de 24 a 48 horas a 37°C.

##### 9.4.5.1 Interpretación de resultados

Positivo = Medio de cultivo azul oscuro.

Negativo o inhibido = Sin cambio.

#### 9.4.6 Prueba en caldo urea

Sembrar masivamente con el cultivo puro, objeto de ensayo.

Incubar hasta 48 horas a 37°C.

##### 9.4.6.1 Interpretación de resultados

Rojo = Urea positivo.

Amarillo = Urea negativo.

#### 9.4.7 Prueba en medio MR-VP

##### 9.4.7.1 Procedimiento

Sembrar en dos tubos de caldo MR-VP con el cultivo puro, objeto de investigación. Incubar hasta 4 días a 37°C.

A continuación se realizan los ensayos:

9.4.7.1.1 Prueba del rojo de metilo: añadir al primer tubo unas 5 gotas de la solución indicadora de rojo de metilo.

9.4.7.1.2 Prueba de Voges-Proskauer: al segundo tubo se le añaden 5 ml de la solución de sulfato de cobre según Leifson o 3 ml de reactivo de Barritt y un ml de hidróxido de potasio al 40% o 5 ml de reactivo de O'Meora. En caso positivo se presenta para los dos primeros métodos después de algunos minutos, un viraje a rojo. Con el reactivo de O'Meora aparece en caso positivo y tras frecuente agitación, una coloración rosa al cabo de unos 20 minutos, iniciándose en la superficie y que se intensifica en el transcurso aproximado de 2 horas.

##### 9.4.7.2 Interpretación de resultados

De anaranjado a rojo = positivo por utilización de glucosa.

De anaranjado a amarillo = negativo.

Rojo = Positivo, por formación de acetoina a partir de glucosa.

Sin reacción = negativo.

#### 9.4.8 Prueba en Medio indol nitrito

##### 9.4.8.1 Formación de nitritos:

Para investigar nitritos utilice 3 tubos separados; uno para el control positivo (*E. coli*), otro para el control negativo y el tercero para la prueba con la cepa en estudio. Inocule masivamente cada tubo por punción. Incube a 35°C de 12 a 24 horas. Agregue aproximadamente 10 gotas (mezcla de partes iguales de las soluciones A+B) del reactivo Griess-Ilosvays.

##### 9.4.8.2 Interpretación de resultados

La formación de un color rojo en uno o 2 minutos indica reducción de nitratos a nitritos (prueba positiva). Si la cantidad de nitritos es elevada el color rojo cambia a amarillo.

Si no aparece color, agregue a los tubos una pizca de zinc en polvo (libre de nitratos y de nitritos)

Observe si se forma el color rojo o el cultivo permanece incoloro.

Si no hubo reducción del nitrato presente en el medio de cultivo por el microorganismo, el zinc lo reducirá a nitrito y se formará un color rojo al reaccionar con el reactivo de Griess-Ilosvays. La prueba entonces será negativa (ausencia de nitrata).

Si no aparece color, esto nos indica que el germen redujo el nitrato presente en el medio de cultivo hasta más allá de la formación de nitritos, posiblemente llegando la reacción hasta nitrógeno gaseoso. La prueba entonces es positiva (presencia de nitrata).

##### 9.4.8.3 Formación de indol

Recubrir el medio con una capa de aproximadamente 0,5 cm de altura del reactivo del indol según Kovacs.

En presencia del indol libre, se presenta al cabo de pocos minutos una coloración rojo cereza en la capa del reactivo.

#### 9.4.9 Prueba en medio SIM

##### 9.4.9.1 Procedimiento

El cultivo puro sometido a examen se siembra por punción en la capa superior del medio de cultivo y se incuba de 18-24 horas a 37°C.

##### 9.4.9.2 Interpretación de resultados

La movilidad se pone de manifiesto por la turbidez difusa del medio de cultivo alrededor del canal de la picadura.

La no movilidad se caracteriza por el crecimiento producido exclusivamente a lo largo de dicho canal. La formación de H<sub>2</sub>S se reconoce por el ennegrecimiento de la zona de crecimiento.

La demostración del indol se efectúa mediante el reactivo de Kovacs. La formación del indol da lugar a una coloración rojo púrpura de la capa de reactivo.

También puede usarse con el mismo propósito la tira de papel filtro impregnada con una solución de ácido oxálico. Esta se coloca seca, en la boca del tubo, virando a un color rosado en el caso de formación de indol.

#### 9.4.10 Prueba en medio MIO

##### 9.4.10.1 Procedimiento

Los cultivos son inoculados por punción en el medio MIO preparado en tubos y se incuban de 18-24 horas a 35°C.

Se leen las reacciones de movilidad y de ornitina descarboxilasa antes de agregar el reactivo de Kovacs para la prueba de indol.

##### 9.4.10.2 Interpretación de resultados

La movilidad es indicada por turbidez del medio o por crecimiento extendido a partir de la línea de inoculación.

La ornitina descarboxilasa es indicada por el color púrpura del medio.

La ornitina negativa produce un color amarillo, en el fondo puede ser púrpura al final.

Para la prueba de indol se añaden de 3-4 gotas de reactivo de Kovacs, y se agita suavemente el tubo. La aparición de color rosa o rojo en el reactivo se interpreta como prueba positiva de indol.

Comparar los resultados obtenidos con un tubo testigo sin sembrarse

#### 9.4.11 Prueba en caldo lisina descarboxilasa

##### 9.4.11.1 Procedimiento

Los tubos con el caldo se inoculan con los microorganismos de prueba y se incuban durante 24 horas de 32-35°C o si se prefiere a 37°C.

Los bacilos entéricos producen ácido en la fermentación inicial de dextrosa, ocasionando un cambio de color amarillo.

Los cultivos que también producen descarboxilación de la lisina, forman cadaverina y el caldo vuelve a tomar el color púrpura alcalino.

## 9.4.11.2 Interpretación de resultados

Un color amarillo después de 24 horas indica un resultado negativo.

El color púrpura es un resultado positivo que indica la descarboxilación de la lisina.

## 9.5 Identificación de bacterias Gram negativas

## 9.5.1 Pruebas para identificación de Pseudomona sp.

## 9.5.1.1 Procedimiento

En caso de que en el medio agar cetrimida se encuentren colonias sospechosas de Pseudomona sp., realizar la prueba de oxidasa y una tinción de Gram (Tabla No. 3).

Observar con luz ultravioleta las colonias desarrolladas y comparar la morfología colonial conforme a la Tabla No. 3.

Tabla No. 3

CARACTERISTICAS DE Pseudomona sp.			
Medio de cultivo	Morfología colonial	Tinción de Gram	Prueba de oxidasa
Agar cetrimida a 37°C o 42°C	Colonias grandes blancas o verdes cremosas.	Bacilos -	+
Agar Pseudomonas F para obtención de fluoresceína	Colonias incoloras o amarillentas, con luz ultravioleta se observan de color amarillento.	Bacilos -	+
Agar Pseudomonas P para detección de pirocianina	Colonias verde-azulosas. Con luz ultravioleta se observan de color azul.	Bacilos -	+

9.5.1.2 La presencia de Pseudomona sp. puede confirmarse, si es necesario, con pruebas bioquímicas mencionadas en los puntos del 9.4.1 al 9.4.11 y comparar con la Tabla No.4.

Tabla No. 4

Pseudomona sp.	
Pruebas bioquímicas	Resultado
H <sub>2</sub> S (formación)	-
Movilidad	+
Indol	-
Urea	d
Lisina descarboxilasa	-
Lactosa	-
VP	d
Citrato de Simmons	+
Manitol	d
Glucosa (gas)	d
Sorbitol	-
Inositol	-
OF/F	-
OF/O	+

+= Positivo

= Negativo

d= Variable

## 9.5.2 Pruebas para identificación de Salmonella sp.

En caso de que en los medios EMB o AMC se encuentren colonias sospechosas de Salmonella (cuadro No. 1), sembrarlas en medio caldo cistina-selenito y caldo tetracionato, incubar durante 12-24 horas a 37°C o 43°C.

## 9.5.2.1 Pruebas selectivas para Salmonella sp.

Si se presenta crecimiento en cualquiera de los medios de enriquecimiento, tomar una azada y aislar por estria cruzada en los siguientes medios: agar verde brillante, agar XLD y agar sulfito de bismuto.

Si son bacilos Gram negativos, correspondiendo a la morfología de Salmonella sp., sembrar por estría y punción en el medio agar triple azúcar-hierro e incubar de 18 a 24 horas a 35°C.

Observar las morfologías coloniales y microscópicas y compararlas con las descritas en la Tabla No.5.

Tabla No. 5

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE Salmonella sp.		
Medio de cultivo	Características morfológicas	Tinción de Gram
Agar verde brillante	Colonias pequeñas transparentes, incoloras, rosas o blancas opacas, frecuentemente rodeadas de una zona rosa o roja.	Bacilos -
Agar xilosa-lisina desoxicolato	Colonias rojas con o sin centro negro.	Bacilos
Agar sulfito de bismuto	Colonias negras o verdes	Bacilos -
Agar hierro triple azúcar	Superficie alcalina (roja) punción ácida (amarilla), con o sin producción de ácido sulfhídrico (negro)	Bacitos -

9.5.2.2 Para confirmación de Salmonella realizar las pruebas bioquímicas mencionadas en los puntos del 9.4.1 al 9.4.11 y comparar con la Tabla No. 6.

Tabla No. 6

Salmonella typhi	
Pruebas bioquímicas	Resultado
TSI: Superficie	K
Punción	A
Gas	-
H <sub>2</sub> S	+
LIA: Superficie	K
Punción	K
Gas -	
H <sub>2</sub> S	+ (-)
MIO: Movilidad	++(-)
Indol	-
Omitina	-
Urea	-
Lisina descarboxilasa	+
Malonato	-
Lactosa -	
VP	-
Citrato de Simmons	-
Manitol	+
Glucosa (gas)	-
Sorbitol	+
Omitina Descarboxilasa	-
Dulcitol	d
Inositol	-
Triolosa	+
Arabinosa	-
Ramnosa	-
Celobiosa	d
Eritritol	-
Acetato de sodio	-
Mucato	-
Fucsina glicerol	-

K= Alcalino

A= Acido



+ = Positivo

- = Negativo

d = Variable

9.5.3 Pruebas selectivas para *Escherichia coli*.

#### 9.5.3.1 Procedimiento

En caso de que encuentren colonias sospechosas de *E. coli* (Tabla No. 1), sembrar por estria cruzada en los medios AMC y agar Levine-cosina azul de metileno e incubar a 35°C. Observar el crecimiento y si ninguna colonia corresponde a la morfología descrita en la Tabla No.1, la muestra cumple los requisitos de ausencia de *Escherichia coli*.

Confirme la presencia utilizando las pruebas bioquímicas mencionadas en los puntos del 9.4.1 al 9.4.11 y comparar con la Tabla No. 7.

Tabla No. 7

Escherichia coli	
Pruebas bioquímicas	Resultado
TSI: Superficie	A
Punción	A
Gas	+
H <sub>2</sub> S -	-
LIA: Superficie	K
Punción	A
Gas	+
H <sub>2</sub> S	-
MIO: Movilidad	+(-)
Indol	+
Urea -	-
Lisina descarboxilasa	+
Malonato -	-
Lactosa	+
VP	-
Citrato de Simmons -	-
Manitol	+
Glucosa (gas)	A
Sorbitol	+
Omitina descarboxilasa	d
Dulcitol	d
Inositol	-
Triolosa	+
Arabinosa	+
Ramnosa	d
Eritritol	-
OF/F y OF/O	+
Mucato	+

K = Alcalino

A = Acido

+ = Positivo

- = Negativo

d = Variable

#### 9.6 Pruebas bioquímicas API

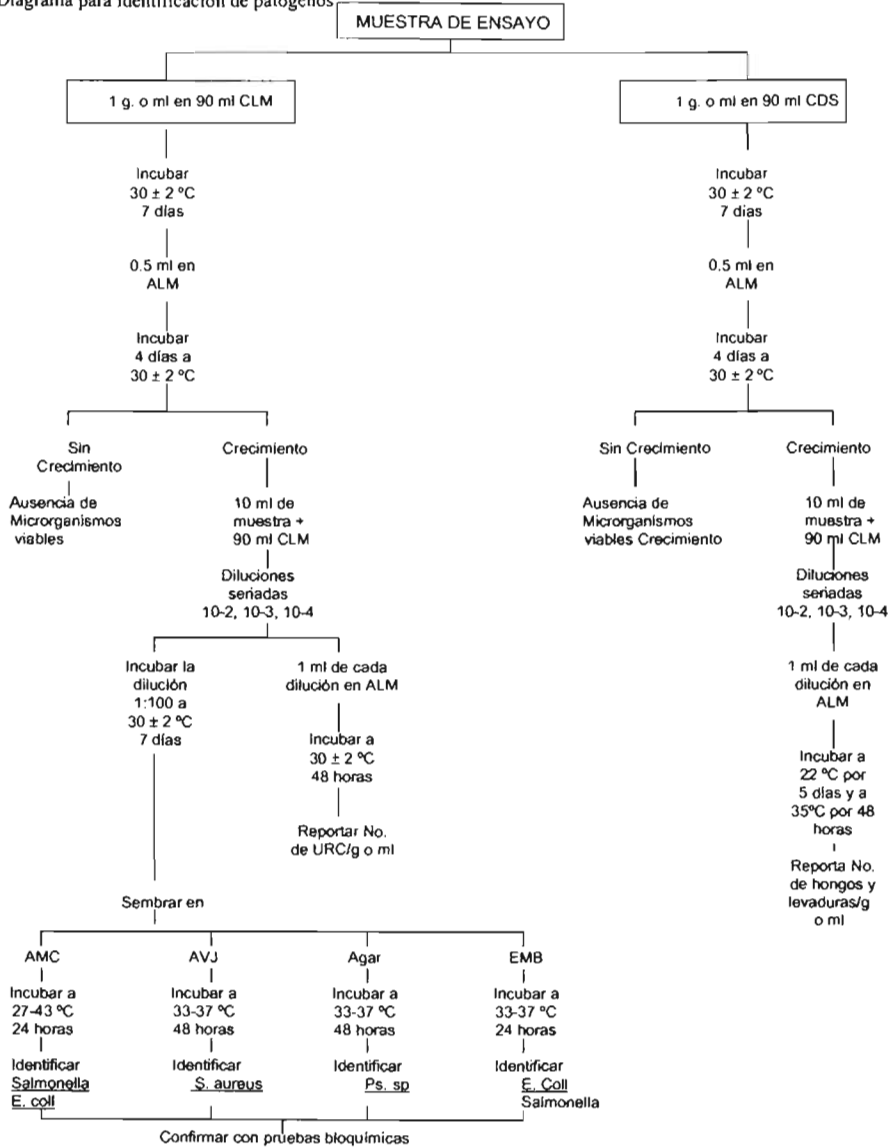
##### 9.6.1 Procedimiento

Aislar la colonia sospechosa en ALM y los medios diferenciales que se mencionan: EMB (*E. coli*), AMC (*S. typhi*) y agar cetrimida (*Ps. sp.*). Incubar a 33-37°C durante 18-24 horas.

Sembrar el sistema API, siguiendo las indicaciones del fabricante. Leer las bioquímicas e identificar al microorganismo haciendo uso del manual de códigos. Corroborar que la morfología colonial de los medios diferenciales sea la correspondiente al microorganismo identificado por el sistema API.

##### 9.7 Diagrama para identificación de patógenos

9.7 Diagrama para identificación de patógenos



10. Concordancia con normas internacionales

Esta norma no tiene concordancia con normas internacionales.

11. Bibliografía

- 11.1 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1992. *Ley Federal sobre Metrología y Normalización*. México, D.F.
- 11.2 Secretaría de Salud. 1984. *Ley General de Salud*. México, D.F.
- 11.3 Secretaría de Salud. 1988. *Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios*. México, D.F.
- 11.4 Secretaría de Salud. 1988. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. 5a. Ed. México, D.F., pp. 201-209.
- 11.5 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. NOM-008-SCFI-1993. *Sistema General de Unidades de Medida*. México, D.F.
- 11.6 Amador, L.R. 1982. *Determinación de la enterotoxigenidad de cepas de Staphylococcus aureus aisladas de productos cárnicos*. Tesis profesional ENCB, IPN, México, D.F.
- 11.7 American Public Health Association. 1976. *Compendium Methods for the Microbiological examination of foods*. Intersociety Agency Committee on Microbiology Methods for Foods. Ed. Marvin L. Speck, pp. 399-407.
- 11.8 *Bacteriological Analytical Manual*. 1984. 6a. Ed. Capítulo 25, pp. 25-26
- 11.9 Cook M., Osol L. y Van Metek T. 1985. *Formación Práctica de Regmington*. 2a. Ed. UTEHA.
- 11.10 CTFA Microbiology Committee. 1985. *Determination of the Microbial Content of Cosmetic Products (M-1) Microbiological Methods Section of the CTFA Technical Guidelines*.
- 11.11 Deacon J.W. 1990 *Introducción a la Micología Moderna*, Ed. Limusa, S.A. de C.V., pp. 11-16.
- 11.12 Difco. *Manual*. 1974. 9th. Ed. Difco Laboratories Detroit Michigan, U.S.A., pp. 501-508.
- 11.13 Don J.J., Farmer III., Hickman F.W., Asbury M.A. and Steigerwalt A.G. 1977. *Enterobacteriaceae*. Center for Disease Control Atlants. G.A., p. 78.
- 11.14 Dr. Bradshaw L.J. 1973. *Microbiología de Laboratorio*. Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V., pp. 228-229.
- 11.15 Ewing W.H. and Martin W.J. 1980. *Enterobacteriaceae Manual of clinical microbiology*. Editors 2nd ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C., USA, p. 207.
- 11.16 Ewing W.H. and Martin W.J. 1973. *Enterobacteriaceae Manual of clinical microbiology*. Editors 2nd ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C., USA, pp. 15-16.
- 11.17 Herrera T., y Ulloa M. 1990. *El reino de los Hongos. Micología básica y aplicada*. Universidad Nacional Autónoma de México, Fondo de Cultura Económica, pp. 19-23.
- 11.18 IPN. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. 1983. *Manual de Laboratorio de Microbiología Sanitaria Ira*. Ed. México, D.F., p. 166.
- 11.19 Jay. J.M. 1978. *Modern Food Microbiology*. Second ed., pp. 321-347.
- 11.20 Lachica R.V.C., Genigeorgis y Horeprich P.D. 1971. *Methacromatic agar Difusion Method for detecting Staphylococcal cleasa activity*. Appl. microbiol 21. USA, pp. 585-587.
- 11.21 Lachica R.V.C., Weiss V.F. y Deibel R.H. 1969. *Relationships among coagulase enterotoxin and heat stable deoxyribonucleasa. Production by Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol 18. USA, pp. 126-127.
- 11.22 Lennette E.H., Spauling y Traunt J.P. 1980. *Enterobacteriaceas Manual of clinical microbiology*. Edition 2nd. American Society for Microbiology. Washington, D.C., USA, p. 207.
- 11.23 MacFaddin J.F. 1980. *Biochemical test for identification of Medical Bacteria*. USA, pp. 220-226.
- 11.24 MacFaddin J.F. 1976. *Biochemical test for Identification of Medical Bacteria*. The Williams & Wilkins Co. Baltimore, USA.
- 11.25 Merck E. 1990. *Manual de Medios de Cultivo*. Darmotadt, Alemania, pp. 206-207.
- 11.26 Ramírez. V.M.P. 1983. *Correlación entre las pruebas de coagulasa y producción de enterotoxina de cepas de Staphylococcus aureus aisladas de productos cárnicos*. Tesis Profesional ENCB, IPN, México, D.F., p. 84.
- 11.27 Reyes. H.M.L. 1981. *Determinación de la enterotoxigenidad de cepas aisladas de quesos*. Tesis profesional. ENCB, IPN, México, D.F., p. 64 y 346.
- 11.28 Rodríguez. M.R. 1980. *Determinación de la toxigenicidad de cepas de Staphylococcus aureus*. Tesis Profesional ENCB, IPN, México, D.F., p. 78.
- 11.29 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1981. *Norma-Z-013/02. Guía para la redacción, estructuración y presentación de las Normas Oficiales Mexicanas*. México, D.F.

## **12. Observancia de la norma**

La vigilancia en el cumplimiento de la presente norma corresponde a la Secretaría de Salud.

## **13. Vigencia**

La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor, con su carácter de obligatoria, a los treinta días siguientes a partir de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

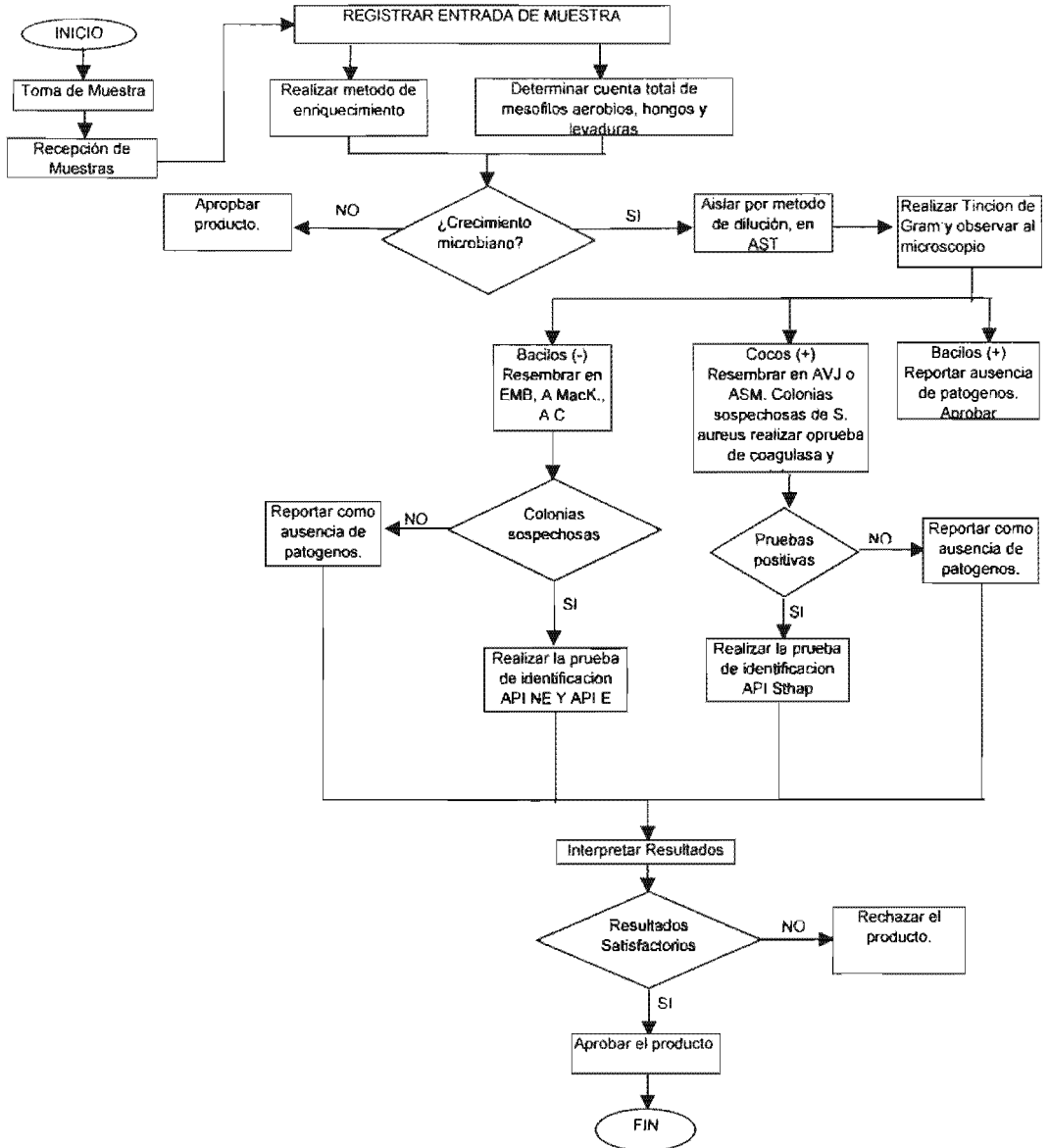
Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 10 de mayo de 1995.- El Director General, José Meljem Moctezuma.- Rúbrica. S

**ANEXO II**  
**DIAGRAMA DE FLUJO**  
**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN GENERAL PARA EL**  
**ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO**

ASEGURAMIENTO DE CALIDAD

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA





**TABLA 1. IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PATOGENOS**

MEDIO DE CULTIVO	MICROORGANISMO	CARACTERÍSTICAS COLONIALES
Agar eosina azul de metileno	<i>Escherichia coli</i>	Colonias pequeñas azul negro en la parte central con brillo metálico verdoso a la luz reflejada
	<i>Salmonella typhi</i>	Transparentes, color ámbar
	<i>Staphylococcus coagulasa (+)</i>	Colonias Incoloras, en punta de alfiler
Agar Mac Conkey	<i>Salmonella, Shigella</i> y otros	Incoloros Transparentes
	<i>Escherichia coli</i>	Grandes, rojas, que pueden estar rodeadas de una zona de precipitación de bilis
	<i>Enteribacter, klebsiella</i>	Grandes, rosadas, mucosas
	Enterococos, Staphylococcus y otros	Diminutas, de crecimientos aislado, opacas
Agar Cetrimida	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Colonias grandes blancas o verdes cremosas
	<i>Escherichia coli</i>	Crece poco, sin pigmento
	<i>Salmonella aureus</i>	No crece
Agar Vogel Jonson	<i>Staphylococcus aureus</i>	Colonias pequeñas, negras, con halo amarillo
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> y otros	Pequeñas, negro-grisáceos, sin halo
	<i>Escherichia coli</i>	No crece
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	No crece

**PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN GENERAL  
PARA LA TOMA DE MUESTRA  
DE GRANEL, PRODUCTO TERMINADO Y MATERIA PRIMA**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-MC-00-36

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 1 DE 3

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

**I N D I C E**

1.0	OBJETIVO
2.0	ALCANCE
3.0	DEFINICIONES
4.0	RESPONSABILIDADES
5.0	DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO
6.0	DISTRIBUCIÓN DEL PROCEDIMIENTO
7.0	REGISTROS
8.0	ANEXOS

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE  
OPERACIÓN GENERAL PARA LA TOMA DE  
MUESTRA DE GRANEL, PRODUCTO  
TERMINADO Y MATERIA PRIMA**

**CÓDIGO**

**PNO-CM-00-36**

**HOJA 2 DE 3**

**REGISTRO DE MODIFICACIONES Y CAMBIOS**

REVISIÓN	FECHA	RESPONSABLE	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO
-----	-----	-----	-----

**1.0 OBJETIVO**

1.1 Establecer un procedimiento de toma de muestra adecuado para obtener muestras representativas, recogidas de forma correcta, aplicando las técnicas más adecuadas.

**2.0 ALCANCE**

2.1 Aplica al área de producción y al departamento de aseguramiento de calidad

**3.0 DEFINICIONES**

3.1 Muestra: porción de la población, seleccionada de tal manera que es representativa de aquella.

3.2 Toma de muestra: Selección de una porción representativa de un lote de producción u otra unidad bruta.

**4.0 RESPONSABILIDADES**

4.1 Corresponde al jefe de aseguramiento de calidad conocer, capacitar y vigilar la aplicación del procedimiento.

4.2 Es responsabilidad del los inspectores seguir el procedimiento.

**5.0 DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO**

5.1 El inspector de materia prima tomará una porción representativa de materia prima y componentes de acuerdo al procedimiento AC002900, realizar el muestreo en cuanto el responsable de almacén informe de la llegada de materia prima o componentes.

5.2 El encargado del área de granel, recolectará las muestras conforme al Método ACO1100, tomar una muestra por lote, si el lote se divide en varias cargas, de cada carga se tomara una muestra, en la etiqueta de identificación se indicara el numero de carga y el total de cargas.

5.3 El inspector de producto terminado cumplirá con el procedimiento SCM-PR-01300 y obtendrá las muestras de producto terminado de cada lote antes de ser llevado a almacén deberá cumplir con el muestreo.

5.4 Todas las muestras que se hayan recogido deberán ser empaquetadas en papel aluminio o en bolsas de polietileno perfectamente selladas. En caso de ser líquidos utilizar frascos de vidrio sanitizados.



**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE  
OPERACIÓN GENERAL PARA LA TOMA DE  
MUESTRA DE GRANEL, PRODUCTO  
TERMINADO Y MATERIA PRIMA**

**CÓDIGO**

**PNO-CM-00-36**

**HOJA 3 DE 3**

- 5.5 Cada muestra deberá portar una etiqueta de identificación (Formato I), en donde la letra debe de ser legible y cerciorarse de que la etiqueta no se llegue a desprender.
- 5.6 Los responsables de realizar el muestreo deben entregar inmediatamente las muestras al laboratorio de microbiología y registrar la entrega de dichas muestras.
- 5.7 El analista microbiológico aceptara las muestras si:  
La etiqueta es legible  
Se ha utilizado el envase correcto  
Esta perfectamente empaquetada  
No hay perdida o escurrimiento de la muestra  
La cantidad es suficiente (2g de granel y producto terminado, 6g de materia prima)
- 5.8 Al ser aceptadas por el químico en microbiología, este registrara su entrada en bitácora Formato II

6.0 DISTRIBUCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

- 6.1 Gerente de producción  
6.2 Jefe de Aseguramiento de Calidad

7.0 REGISTROS

- 7.1 Bitácora de muestreo de materia prima y componentes.  
7.2 Bitácora de muestreo de granel.  
7.3 Bitácora de muestreo de producto terminado.  
7.4 Bitácora de microbiología de granel y producto terminado.  
7.5 Bitácora de microbiología de materia prima.

8.0 ANEXOS

- 8.1 Anexo I: Formato de la etiqueta de identificación.  
8.2 Anexo II: Formato de la bitácora de microbiología.

## Anexo I: Formato de la etiqueta de Identificación.

Para granel y producto terminado:

ETIQUETA DE IDENTIFICACIÓN
Cliente:
Descripción de la muestra:
No. Pedido:
No. Lote:
Fecha de Muestreo:

Para materia prima y componentes:

ETIQUETA DE IDENTIFICACIÓN
Proveedor:
Descripción de la muestra:
No. Pedido:
No. Lote:
Fecha de Muestreo:



**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN GENERAL  
PARA EL USO Y MANTENIMIENTO DE EQUIPOS**

NUMERO DE REVISIÓN _____	CÓDIGO PNO-CM-00-37
FECHA DE REVISIÓN: _____	HOJA 1 DE 3

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

**I N D I C E**

- 1.0 OBJETIVO
- 2.0 ALCANCE
- 3.0 DEFINICIONES
- 4.0 RESPONSABILIDADES
- 5.0 DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO
- 6.0 DISTRIBUCIÓN DEL PROCEDIMIENTO
- 7.0 REGISTROS
- 8.0 ANEXOS

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE  
OPERACIÓN GENERAL PARA EL USO Y  
MANTENIMIENTO DE EQUIPOS**

CÓDIGO

PNO-CM-00-37

HOJA 2 DE 3

**REGISTRO DE MODIFICACIONES Y CAMBIOS**

REVISIÓN	FECHA	RESPONSABLE	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO
-----	-----	-----	-----

1.0 OBJETIVO

1.1 Asegurar el funcionamiento y mantenimiento de los equipos durante su uso en cada tipo de análisis; realizando una calibración y una verificación se evitara que estos influyan en los resultados de los análisis.

2.0 ALCANCE

2.1 Aplica a todos los equipos utilizados para los análisis microbiológicos que se encuentran dentro del laboratorio de microbiología y el área de aseguramiento de calidad.

3.0 DEFINICIONES

3.1 Equipo: Se consideran todos aquellos aparatos y utensilios que son necesarios para llevar a cabo las operaciones en el manejo de materiales y que no proporcionan resultados cuantitativos..

3.2 Instrumentos: Se consideran todos aquellos aparatos que proporcionan datos cuantitativos, medibles, como son termómetros, instrumentos para medir para medir volúmenes , basculas, balanzas y equipos contadores.

3.3 Mantenimiento: Conjunto de operaciones y cuidados necesarios para que instalaciones y equipos puedan seguir funcionando adecuadamente.

3.4 Calibración: Consiste en la determinación de la desviación que presenta un equipo de medida frente a un patrón y, en los casos en que sea necesario determinar otras propiedades metroológicas.

3.5 Verificación: Comprobación de que el dispositivo de medida cumple totalmente con los requisitos especificados para el tipo de análisis que se va a realizar y aplicados durante el período de verificación.

3.6 Validación: Comparación de los datos obtenidos frente a criterios preestablecidos.

3.7 Ajuste: Efectuar las acciones necesarias para garantizar que el dispositivo de medida funciona en forma adecuada para que pueda ser empleado en el uso previsto.

4.0 RESPONSABILIDADES

4.1 Es responsabilidad del Jefe de Aseguramiento de Calidad conocer y vigilar el cumplimiento de los lineamientos del procedimiento.

4.2 Es obligación del responsable de Microbiología seguir y aplicar el procedimiento.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE  
OPERACIÓN GENERAL PARA EL USO Y  
MANTENIMIENTO DE EQUIPOS**

CÓDIGO

PNO-CM-00-37

HOJA 3 DE 3

**5.0 DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO**

5.1 Es obligación del responsable de microbiología:

5.1.1 Vigilar que los equipos solo sean operados por personal autorizado, el cual deberá estar capacitado sobre el correcto funcionamiento y mantenimiento de los equipos.

5.1.2 Verificar que antes de hacer uso de los equipos se efectuó una limpieza y sanitización.

5.1.3 Anotar en los registros gráficos los datos solicitados para cada equipo.

5.1.4 Llevar a cabo la calibración, verificación, control y registro de los equipos críticos, cumpliendo con los Métodos de Uso que existen para cada uno de ellos.

Se consideran equipo críticos:

Autoclave  
Horno eléctrico  
Estufa de Incubación  
Potenciómetro  
Campana de flujo laminar  
Termómetros  
Microscopio

5.1.5 Avisar al jefe de aseguramiento de calidad sobre las desviaciones que presenten los equipos, al ser calibrados o verificados, para que este solicite una reparación externa.

5.1.6 Reportar al jefe de mantenimiento cualquier falla que presenten los equipos para que se les efectúe una reparación, una vez reparado el equipo será necesario realizar una calibración y verificación conforme a los método de uso.

5.2 La operación de cualquier equipo se apegara estrictamente al procedimiento normalizado de operación correspondiente.

**6.0 DISTRIBUCIÓN DEL PROCEDIMIENTO**

6.1 Jefe de aseguramiento de calidad.

6.2 Responsable del área de microbiología.

**7.0 REGISTROS**

7.1 Bitácora de calibración interna.

**8.0 ANEXOS**

8.1 Anexo I: Formato de bitácora de calibración interna.



**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN GENERAL  
PARA LAS ESPECIFICACIONES DEL MATERIAL UTILIZADO EN EL  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA**

NUMERO DE REVISIÓN _____	CÓDIGO PNO-CM-00-38
FECHA DE REVISIÓN: _____	HOJA 1 DE 4

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

**I N D I C E**

- 1.0 OBJETIVO
- 2.0 ALCANCE
- 3.0 DEFINICIONES
- 4.0 RESPONSABILIDADES
- 5.0 DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO
- 6.0 DISTRIBUCIÓN DEL PROCEDIMIENTO
- 7.0 REGISTROS
- 8.0 ANEXOS



	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN GENERAL PARA LAS ESPECIFICACIONES DEL MATERIAL UTILIZADO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>CÓDIGO</b>
		<b>PNO-CM-00-38</b>
		<b>HOJA 2 DE 4</b>

**REGISTRO DE MODIFICACIONES Y CAMBIOS**

REVISIÓN	FECHA	RESPONSABLE	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO
-----	-----	-----	-----

1.0 OBJETIVO

1.1 Describir un procedimiento de control de la calidad de los materiales utilizados en el laboratorio de microbiología, evitando así resultados erróneos difíciles de detectar.

2.0 ALCANCE

2.1 Aplica a todo el material utilizado en el laboratorio de microbiología.

3.0 DEFINICIONES

Materiales: Conjunto de instrumentos, herramientas o máquinas necesarios para un fin necesario.

4.0 RESPONSABILIDADES

4.1 Corresponde al jefe de aseguramiento de calidad , suministrar al laboratorio de microbiología los materiales con las especificaciones requeridas.

4.2 Es responsabilidad del químico microbiólogo cuidar y mantener funcional, todo el material utilizado en el laboratorio de microbiología.

5.0 DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO

5.1 **Envases de Toma de Muestra**

Es responsabilidad del Microbiólogo, vigilar que las muestras estén contenidas en envases adecuados y que dichos envases cumplan con los requerimientos para ser utilizados.

5.1.1 Envases de vidrio

Los envases de vidrio deberán ser de boca ancha para evitar la contaminación externa, con tapón de rosca de plástico, estos envases se utilizaran para delineadores líquidos, maquillajes fluidos y gloss. Los envases y tapas serán sanitizadas por el microbiólogo el cual los proporcionara al encargado de muestreo.

5.1.2 Bolsas de plástico estériles

Para el muestreo de agua se utilizaran bolsas de plástico de 100mL de capacidad, estériles que contengan tío-sulfato sodico.

5.1.3 Bolsas de plástico

Las bolsas de plástico serán de un solo uso y después se desecharan. Serán utilizadas para puntillas, pastas, polvos.

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
GENERAL PARA LAS ESPECIFICACIONES DEL  
MATERIAL UTILIZADO EN EL LABORATORIO  
DE MICROBIOLOGÍA

CÓDIGO

PNO-CM-00-38

HOJA 3 DE 4

5.2 **Material de Vidrio**

- 5.2.1 El jefe de aseguramiento de calidad deberá solicitar la compra de materiales que cumplan con las especificaciones que se citan a continuación:
- 5.2.1.1 El material volumétrico empleado deberá ser de vidrio borosilicato resistente al calor.
  - 5.2.1.2 El material volumétrico debe ser de clase A y ser capaz de soportar esterilizaciones repetidas sin modificar significativamente su volumen.
  - 5.2.1.3 Las pipetas deberán de ser del tipo vertido, es decir que el volumen nominal está contenido entre la marca de la graduación y la punta.
  - 5.2.1.4 Las cajas de Petri serán de 90 ó 100 mm de diámetro, teniendo tapas con tres o cuatro topes que permiten el intercambio de aire entre el interior y el exterior.
  - 5.2.1.5 Las asas de inoculación deberán ser de hilos de níquel-cromo.
  - 5.2.1.6 Las espátulas deben ser de metal resistentes a la corrosión.
- 5.2.2 El químico en microbiología deberá:
- 5.2.2.1 Retirar del laboratorio todo el material dañado, como metales agrietados, vidrios resquebrajados o rajados y plásticos rayados que se encuentren en uso.
  - 5.2.2.1 Todo el material retirado del laboratorio por estar dañado colocarlo en la caja de material dañado para que sea reparado.
  - 5.2.2.3 Evitar que el material de Microbiología sea usado para análisis químicos.
  - 5.2.2.4 Observar que al ser lavado el material de vidrio este quede brillante, libre de residuos en caso contrario realizar otro lavado realizar las pruebas de cloruros y fenoltaleína. Ver **PNO-CM-00-29**.
  - 5.2.2.5 Desechar las pipetas que tengan la punta rota, colocarlas en los contenedores de confinamiento de material de vidrio.
- 5.3 **Limpieza y Esterilización del Material**  
El Microbiólogo vigilara que se realice:
- 5.3.1 El procedimiento de limpieza de la siguiente forma: lavado con detergente a 70°C, aclarado con agua del grifo a 80°C y aclarado final con agua desmineralizada.
  - 5.3.2 Y que una vez seco el material realizar las pruebas de cloruros, acidez y alcalinidad con la prueba de fenoltaleína como lo indica el **PNO-CM-00-29**.
  - 5.3.3 Todos los recipientes contaminados por cultivos deberán esterilizarse en autoclave antes de su lavado. Ver **PNO-CM-00-30**.

	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN GENERAL PARA LAS ESPECIFICACIONES DEL MATERIAL UTILIZADO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>CÓDIGO</b>
		<b>PNO-CM-00-38</b>
		<b>HOJA 4 DE 4</b>

6.0 DISTRIBUCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

6.1 Jefe de aseguramiento de calidad.

6.2 Químico en microbiología.

7.0 REGISTROS

7.1 Inventario del material del laboratorio microbiología.

8.0 ANEXOS

8.1 Anexo I: Formato del inventario del material del laboratorio microbiología.



**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
GENERAL PARA LAS ESPECIFICACIONES  
PARA MEDIOS DE CULTIVO**

NUMERO DE REVISIÓN _____	CÓDIGO PNO-CM-00-39
FECHA DE REVISIÓN: _____	HOJA 1 DE 4

	ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

**I N D I C E**

- 1.0 OBJETIVO
- 2.0 ALCANCE
- 3.0 DEFINICIONES
- 4.0 RESPONSABILIDADES
- 5.0 DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO
- 6.0 DISTRIBUCIÓN DEL PROCEDIMIENTO
- 7.0 REGISTROS
- 8.0 ANEXOS

	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN GENERAL PARA LAS ESPECIFICACIONES DE MEDIOS DE CULTIVO</b>	<b>CÓDIGO</b>
		<b>PNO-CM-00-39</b>
		<b>HOJA 2 DE 4</b>

**REGISTRO DE MODIFICACIONES Y CAMBIOS**

REVISIÓN	FECHA	RESPONSABLE	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO
-----	-----	-----	-----

1.0 OBJETIVO

1.1 Garantizar la funcionalidad de los medios de cultivo deshidratados, realizando controles de calidad.

2.0 ALCANCE

2.1 Aplica a todos los medios de cultivo deshidratados que ingresen al laboratorio de microbiología.

3.0 DEFINICIONES

3.1 Medio: cualquier material líquido, sólido o semisólido, que soporta el crecimiento de microorganismos. Se le denomina medio de cultivo a las diferentes mezclas de sustancias nutritivas empleadas en el laboratorio para el cultivo de microorganismos.

3.2 pH: índice que expresa el grado de acidez o alcalinidad de una disolución. Entre 0 y 7 la disolución es ácida y de 7 a 14 es básica.

3.3 Medios sintéticos o químicamente definidos: llevan fuente de carbono, fuente de nitrógeno, sales otros elementos como son estimuladores del crecimiento pero siempre a concentraciones conocidas.

3.4 Medios complejos: estos medios llevan ingredientes como extracto de levadura, peptona, infusión de cerebro, extracto de carne, etc. que contienen nutrientes en abundancia pero sin saber con exactitud la composición cualitativa ni cuantitativa de estos nutrientes.

3.5 Medios de enriquecimiento: son medios complejos (normalmente) con aditivos adicionales para favorecer el crecimiento de determinados microorganismos (particularmente heterótrofos exigentes). Ejemplo: adicción de sangre, suero o extractos de tejidos de animales y plantas.

3.6 Medios selectivos: son aquellos que favorecen el crecimiento específico de un microorganismo particular (o grupo de microorganismos). Es de gran utilidad para el aislamiento de microorganismos a partir de una población microbiana mixta. Ejemplo: CO2 como fuente de carbono es selectivo para autótrofos; adicionando cristal violeta se inhibe el crecimiento de los Gram (+); utilizando maltosa como única fuente de carbono sólo crecerán los que usen maltosa.

3.7 Medios diferenciales: son destinados a facilitar la discriminación de microorganismos de una mezcla por sus propiedades diferenciales de crecimiento en dichos medios. Ejemplo: Agar sangre diferencia hemolíticos de no hemolíticos; McConkey diferencia lactosa (+) de lactosa (-).

3.8 Medios de mantenimiento: suelen ser distintos a los de crecimiento óptimo ya que el crecimiento rápido y prolífico suele ocasionar la muerte rápida de las células. Ejemplo: al añadir glucosa y utilizarla

	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN GENERAL PARA LAS ESPECIFICACIONES DE MEDIOS DE CULTIVO</b>	<b>CÓDIGO</b>
		<b>PNO-CM-00-39</b>
		<b>HOJA 3 DE 4</b>

los microorganismos producen ácidos, acidificándose el medio por lo que es preferible no utilizar glucosa en los medios de mantenimiento.

#### 4.0 RESPONSABILIDADES

4.1 Es responsabilidad del microbiólogo llevar a cabo este procedimiento al pie de la letra.

#### 5.0 DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO

5.1 El químico en microbiólogo deberá:

5.1.1 En el momento de la recepción comprobar y registrar cada envío de medios de cultivo deshidratados, detectando que los envases se encuentren perfectamente bien cerrados, que sean los medios solicitados y las cantidades requeridas.

5.1.2 Realizar un registro que constara en documentar el nombre del fabricante, nombre del producto, fecha de recepción, cantidad, número de lote y fecha de caducidad.

5.1.3 Almacenar los medios de cultivo deshidratados a temperatura ambiente, en un lugar seco y protegidos de la luz.

5.1.4 Anotar en cada recipiente las fechas de recepción y apertura.

5.1.5 Seguir el procedimiento de preparación de medios de cultivo, registrar los siguientes datos en el registro de preparación de medios de cultivo:

- 1.- Fecha de preparación
- 2.- Tipo de Medio de Cultivo
- 3.- Cantidad de Polvo deshidratado
- 4.- Volumen de Agua
- 5.- Número y volúmenes de recipientes preparados (tubos o frascos).
- 6.- pH del medio de Cultivo

5.1.6 Para la preparación de medios de cultivo se utiliza agua limpia, recién destilada o recién desmineralizada.

5.1.7 Los recipientes destinados a la preparación (matraces Erlenmeyer) se limpiarán escrupulosamente con el agua que se ha descrito en el párrafo anterior, para eliminar totalmente eventuales residuos de otras sustancias. Los recipientes destinados a la preparación de medios de cultivo deben ser suficientemente grandes para que el medio de cultivo que se prepara pueda ser agitado con facilidad y concienzudamente. A ser posible, no se prepararán más de 1-2 litros por recipiente.

5.1.8 Todo tipo de medio de cultivo es sensible al calentamiento. Por este motivo, no debe calentarse más de lo estrictamente necesario .

5.1.9 Realizara el control de pH durante la preparación, haciendo uso del potenciómetro calibrado a temperatura ambiente, las rectificaciones del pH se realizarán utilizando HCL 1N o NaOH 1N.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO  
DE OPERACIÓN GENERAL  
PARA LAS ESPECIFICACIONES  
DE MEDIOS DE CULTIVO**

**CÓDIGO**

**PNO-CM-00-39**

**HOJA 4 DE 4**

- 5.1.10 Esterilizar los medios antes de que transcurran tres o cuatro horas desde su preparación.
- 5.1.11 Realizar un control de esterilidad de los medios de cultivo, de cada preparación de medios, sea líquido o sólido se pondrá una placa o tubo testigo, si tras la incubación se observa crecimiento se aislara e identificara al microorganismo, todas las muestras trabajadas con ese medio preparado serán reanalizadas con otro lote de medios de cultivo y el lote de los medios de cultivo será rechazado.
- 5.1.12 Realizar un control de la calidad de los medios de cultivo por promoción de crecimiento utilizando el método ecometrico (MosseI et al., 1980), aplicara este método a cada nuevo lote que se registre en el laboratorio de Microbiología.

**6.0 DISTRIBUCIÓN DEL PROCEDIMIENTO**

- 6.1 Jefe de Aseguramiento de Calidad.
- 6.2 Responsable del Área de Microbiología.

**7.0 REGISTROS**

- 7.1 Registro de Recepción de Medios de Cultivo
- 7.2 Registro de Preparación de Medios de Cultivo

**8.0 ANEXOS**

- 8.1 Anexo I: Registro de Recepción de Medios de Cultivo
- 8.2 Anexo II: Registro de Preparación de Medios de Cultivo
- 8.3 Anexo III: Probables causas de error en la preparación de medios de cultivo deshidratados







**ANEXO III**  
**PROBABLES CAUSAS DE ERROR EN LA**  
**PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO**  
**DESHIDRATADOS**

FALLA	CAUSA PROBABLE
1.- Problemas de pH y cambios de color en el medio de cultivo.	Sobrecalentamiento, mezclado inadecuado, exceso de tiempo en el esterilizador; empleo de material de vidrio con álcali, recipientes contaminados, agua destilada impura, por fundir el medio en varias ocasiones, almacenamiento a altas temperaturas, hidrólisis de los ingredientes.
2.- Solubilidad incompleta	Calentamiento inadecuado, mezcla incompleta por lo que se sobrecalientan algunas porciones del medio, agua destilada de mala calidad, recipiente demasiado pequeño por lo que no es posible homogenizar el líquido. En algunos casos existe un precipitado después de esterilizar el medio, por lo que es necesario agitar suavemente el matraz antes de vaciarlo en las cajas Petri.
3.- Obscurecimiento	Sobrecalentamiento al disolver el agar o al esterilizarlo.
4.- Falta de dureza en el Agar	El agar no está en solución, mezclado ineficientemente, pesado erróneo del polvo deshidratado, pH del medio demasiado ácido, exceso de inóculo en el Agar por lo que éste quedará diluido. Por fundir el agar varias ocasiones.
5.- Pérdidas de las propiedades nutricionales o cambios en las características del crecimiento	Por fundir el Agar en varias ocasiones, calentamiento prolongado o excesivo, mezcla inadecuada, material quemado en las paredes del recipiente, demasiado inóculo.

**PROCEDIMIENTOS  
NORMALIZADOS  
DE OPERACIÓN  
ESPECIFICOS**

## LISTA DE PROCEDIMIENTOS ESPECIFICOS

**PNO-CM-00-01.** Procedimiento normalizado de operación de enriquecimiento para la determinación de macroorganismos patógenos.

**PNO-CM-00-40.** Procedimiento normalizado de operación para la cuenta total de mesofílicos aerobios, hongos y levaduras.

**PNO-CM-00-02.** Procedimiento normalizado para el análisis microbiológico del agua.

**PNO-CM-00-03.** Procedimiento normalizado de operación para sembrar por el método de dilución y Método de aislamiento por estria.

**PNO-CM-00-04.** Procedimiento normalizado de operación para la siembra por la técnica de vaciado en caja.

**PNO-CM-00-05.** Procedimiento normalizado de operación para la prueba de la oxidasa.

**PNO-CM-00-06.** Procedimiento normalizado de operación para la tinción de Gram.

**PNO-CM-00-07.** Procedimiento normalizado de operación para la prueba de la Catalasa.

**PNO-CM-00-08.** Procedimiento normalizado de operación Prueba de la Coagulasa.

**PNO-CM-00-09.** Procedimiento normalizado de operación para la prueba de la Coagulasa.

**PNO-CM-00-10.** Procedimiento normalizado de operación para la identificación de staphylococcus.

**PNO-CM-00-11.** Procedimiento normalizado de operación para la identificación de bacilos Gram negativos no entero-bacterias.

**PNO-CM-00-12.** Procedimiento normalizado de operación para la identificación de bacilos Gram negativos y entero-bacterias.

**PNO-CM-00-13.** Procedimiento normalizado de operación para la toma de muestra del medio ambiente.

**PNO-CM-00-14.** Procedimiento normalizado de operación para la toma de muestra del equipo de trabajo.

**PNO-CM-00-15.** Procedimiento normalizado de operación para la toma de muestra del personal.

**PNO-CM-00-16.** Procedimiento normalizado de operación para el monitoreo del proceso de esterilización por calor húmedo.

**PNO-CM-00-17.** Procedimiento normalizado de operación para el monitoreo del proceso de esterilización por calor seco

**PNO-CM-00-18.** Procedimiento normalizado de operación para la preparación del área de trabajo.

**PNO-CM-00-19.** Procedimiento normalizado de operación para la extracción del producto de su contenedor.

**PNO-CM-00-20.** Procedimiento normalizado de operación para la inactivación de conservadores presentes en las muestras.

**PNO-CM-00-21.** Procedimiento normalizado de operación para la preparación de soluciones y reactivos.

**PNO-CM-00-22.** Procedimiento normalizado de operación para el manejo y uso del microscopio MICRO STAR ONE TEN.

**PNO-CM-00-23.** Procedimiento normalizado de operación para el uso, manejo y limpieza del horno marca ROCHA.

**PNO-CM-00-24.** Procedimiento normalizado de operación para el uso, manejo y limpieza de la campana de flujo laminar marca VECO.

**PNO-CM-00-25.** Procedimiento normalizado de operación para el uso, manejo y limpieza de la estufa marca RJOSSA.

**PNO-CM-00-26.** Procedimiento normalizado de operación para el uso, manejo y limpieza del autoclave marca METRON.

**PNO-CM-00-27.** Procedimiento normalizado de operación para el uso, manejo y limpieza del potenciómetro pH METER 220.

**PNO-CM-00-28.** Procedimiento normalizado de operación para la verificación de termómetros.

**PNO-CM-00-29.** Procedimiento normalizado de operación para el lavado del material empleado en el laboratorio de microbiología.

**PNO-CM-00-30.** Procedimiento normalizado de operación para la esterilización del material empleado en el laboratorio de microbiología.

**PNO-CM-00-31.** Procedimiento normalizado de operación para la preparación de medios de cultivo sólidos.

**PNO-CM-00-32.** Procedimiento normalizado de operación para la preparación de medios de cultivo líquidos.

**PNO-CM-00-33.** Procedimiento normalizado de operación de la técnica ecometrica para la validación de medios de cultivo.

**PNO-CM-00-34.** Procedimiento normalizado de operación para la resiembra de cepas de referencia.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
DE ENRIQUECIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN  
DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS**

NUMERO DE REVISIÓN _____	CÓDIGO <b>PNO-CM-00-01</b>
FECHA DE REVISIÓN: _____	HOJA 1 DE 1

	ELABORO	REVISÓ	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

**1.0 OBJETIVO**

1.1 Describir el método microbiológico de enriquecimiento, que favorece el crecimiento de los microorganismos, para determinar la presencia de <10 UFC/ml o gramo y ausencia de patógenos.

**2.0 INTRODUCCIÓN**

2.1 El método de enriquecimiento es un método cualitativo muy sensible que permite la evaluación microbiana. Una cantidad moderada de la muestra se diluye en un caldo de enriquecimiento, promoviendo el desarrollo de los microorganismos.

**3.0 MATERIAL Y EQUIPO**

- 3.1 Tubos estériles con 40 mL de CLM o CST pre-vertidos.
- 3.2 Estufa 30-34°C.
- 3.3 Campana de Flujo laminar.

**4.0 TÉCNICA**

- 4.1 Transferir 40 ml de CLT o CST a la bolsa estéril que contiene la muestra y la solución neutralizadora dilución 1:10.
- 4.2 Incubar 48 horas a 30-35°C.

**5.0 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

- 5.1 Examinar las bolsas, la presencia de turbidez y/o mal olor se reporta como positivo y se realiza una resiembra. Ver PNO-CM-00-03.
- 5.2 Si no hay turbidez y/o mal olor, reportar como ausencia de patógenos.
- 5.3 Registrar los resultados en la bitácora según el formato II del PNO-CM-00-35.



**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA CUENTA TOTAL DE MESOFILICOS AEROBIOS,  
HONGOS Y LEVADURAS**

NUMERO DE REVISIÓN _____	CÓDIGO PNO-CM-00-40
FECHA DE REVISIÓN: _____	HOJA 1 DE 2

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

1.0 OBJETIVO

1.1 Describir un Método que permita estimar el numero de colonias por gr. o ml presente en una muestra.

2.0 INTRODUCCIÓN

2.1 Los análisis microbiológicos se realizan por el método de vaciado en placa en el cual la muestra previamente homogeneizada y /o disuelta en una solución neutralizante, se vierte en cajas Petri y posteriormente se mezcla con agar previamente fundido y esterilizado. Después de dejar solidificar y someterse a un período de incubación, se procede a contar el número de colonias presentes y se calcula el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por gramo ó mililitro de muestra analizada.

3.0 MATERIALES Y EQUIPO

- 3.1 Cajas Petri estériles
- 3.2 Pipetas de 2 mL estériles
- 3.3 Marcador Indeleble
- 3.4 Medio de AST estéril
- 3.5 Medio de ADS estéril
- 3.6 Estufa a 30-35°C

4.0 TÉCNICA

- 4.1 Identificar 2 cajas, una con TSA y otra con DSA. Anotar también el número de registro que corresponda a cada muestra, fecha de inicio y termino del análisis.
- 4.2 Con una pipeta de 2 mL estéril, transferir 1 mL de la muestra ya preparada con la solución neutralizadora de dilución 1:10 a cada una de las cajas.
- 4.3 Adicionar a las cajas marcadas con TSA de 15 a 20 mL de agar soya tripticaseína.
- 4.4 Homogeneizar y dejar solidificar.
- 4.5 Invertir las cajas e incubar a 30-35°C por 48 horas.

	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA LA CUENTA TOTAL DE MESOFILICOS AEROBIOS, HONGOS Y LEVADURAS</b>	
	NUMERO DE REVISIÓN _____	CÓDIGO <b>PNO-CM-00-40</b>
	FECHA DE REVISIÓN: _____	HOJA 2 DE 2

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

4.6 Adicionar a las cajas marcadas con SDA de 15 a 20 ml de agar dextrosa sabouraud.

4.7 Homogeneizar y dejar solidificar.

4.8 Invertir las cajas e incubar a 20-25°C por 4 días.

5.0 **INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

5.1 **Cuenta total de hongos y levaduras**

5.1.1 Después del período de incubación contar el número de colonias, multiplicar por el inverso de la dilución y reportar el resultado como UFC/g ó mL de muestra.

5.2 **Cuenta total de hongos y levaduras**

5.2.1 Contar el número de hongos y levaduras que se encuentren. Reportar el número de colonias/mL o g de muestra multiplicando por el Inverso de la dilución .

5.3 Registrar los datos en la bitácora según el formato II del PNO-CM-00-35.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGUA**

<b>NUMERO DE REVISIÓN</b> _____	<b>CÓDIGO</b> <b>PNO-CM-00-02</b>
<b>FECHA DE REVISIÓN:</b> _____	<b>HOJA 1 DE 2</b>

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
<b>FIRMA</b>			
<b>NOMBRE</b>	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
<b>FECHA</b>			

1.0 **OBJETIVO**

1.1 Establecer un Método Microbiológico para determinar si están presentes microorganismos coliformes en el agua potable, por medio de la técnica de cuenta en placa y filtración por membrana.

2.0 **INTRODUCCIÓN**

2.1 Debido a que el agua puede poseer diferentes cargas microbianas dependiendo de su forma de obtención, distribución y/o almacenamiento, se hace necesario establecer criterios generales para saber la calidad microbiológica del agua utilizada en el proceso de producción y de uso humano. Conviene destacar la importancia que tienen las cifras de *Escherichia coli* y coliformes, pertenecientes a las enterobacterias que fermentan lactosa con producción de gas y ácido. Para determinar el número de estas bacterias se suele emplear medio selectivo de Endo.

3.0 **MATERIAL Y REACTIVOS**

- 3.1 Bolsas Estériles de 125-250 mL de capacidad.
- 3.2 Algodón
- 3.3 Alcohol 70%
- 3.4 Pipetas de 2mL estériles.
- 3.5 Cajas Petri estériles
- 3.6 Cajas Petri con 5 mL de agar ENDO
- 3.7 Filtro estéril
- 3.8 Membranas de filtración con poros de diámetro 0.45um.
- 3.9 Pinzas estériles

4.0 **TÉCNICA**

4.1 **Toma de muestra**

- 4.1.1 Identificar todas las tomas de agua
- 4.1.2 Remover los accesorios o aditamentos externos del grifo antes de tomar de muestra.
- 4.1.3 Limpiar el orificio de salida con una torunda de algodón impregnada de alcohol al 70%.
- 4.1.4 Dejar correr el agua aproximadamente 1 minuto.
- 4.1.5 Rasgar la bolsa estéril a lo largo de la perforación.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGUA**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
**PNO-CM-00-02**

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

**HOJA 2 DE 2**

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
<b>FIRMA</b>			
<b>NOMBRE</b>	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
<b>FECHA</b>			

- 4.1.6 Abrir la bolsa cerca del grifo.
- 4.1.7 Tomar la muestra , hasta el nivel indicado en la bolsa.
- 4.1.8 Cerrar inmediatamente la bolsa e identificar con todos los datos necesarios.
- 4.1.9 Transportar al laboratorio de microbiología.
- 4.2 **Análisis Microbiológico**
- 4.2.1 Sembrar 1 mL de muestra a cada caja Petri y por duplicado, utilizando la técnica de vaciado en caja utilizando Agar Soya tripticaseína.
- 4.2.2 Incubar de 33-37°C durante 24 horas.
- 4.2.4 Hacer pasar 100mL de agua por el filtro utilizando la membrana de filtración y con la ayuda de una bomba de vacío.
- 4.2.5 Con las pinzas estériles tomar la membrana y depositarla en la caja Petri que contiene el agar ENDO.
- 4.2.6 Incubar de 33-37°C durante 24 horas.
- 5.0 **INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**
- 5.1 Realizar las lecturas de la cuenta total en agar soya tripticaseína de las dos cajas Petri se obtiene un promedio el cual no debe exceder de 100 UFC/mL para ser aprobado y se reporta como <100UFC/ml en caso de no encontrar colonia alguna.
- 5.2 En las cajas de agar ENDO se buscara la presencia de *Escherichia coli* y coliformes pertenecientes a la familia de Enterobacterias fermentadoras de lactosa y productoras de gas, las colonias típicas son pequeñas y de color negro.  
Debe de haber ausencia de estos microorganismos y se reporta como ausencia de patógenos
- 6.0 **ANEXOS**
- 6.1 Anexo I: Registro de análisis microbiológico del agua.



**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA SEMBRAR POR EL MÉTODO DE DILUCIÓN  
Y MÉTODO DE AISLAMIENTO POR ESTRÍA**

NUMERO DE REVISIÓN _____	CÓDIGO <b>PNO-CM-00-03</b>
FECHA DE REVISIÓN: _____	HOJA 1 DE 2

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

1.0 OBJETIVO

1.1 Describir la técnica de sembrado para ir al aislamiento de colonias, utilizando el método de estría y el método de extensión

2.0 INTRODUCCIÓN

2.1 Para los subsecuentes análisis microbiológicos es necesario tener al microorganismo bien identificado y puro, para ello se cuenta con técnicas de sembrado en las que el inóculo se dispersa en estrías con movimientos de arriba hacia abajo logrando obtener colonias aisladas.

3.0 MATERIALES Y EQUIPO

- 3.1 Placas con medio de cultivo gelificado.
- 3.2 Asas de inoculación
- 3.3 Mechero de Bunsen
- 3.4 Alcohol al 70%

4.0 TÉCNICA

4.1 **Método de Aislamiento por Estría**

- 4.1.1 Flamear al rojo vivo el asa de inoculación,
- 4.1.2 Enfriar el asa introduciéndola en el agar en el que se va a realizar el sembrado.
- 4.1.3 Tomar una asada de la colonia o del medio líquido, según sea la procedencia del inóculo.
- 4.1.4 Poner el inóculo en el centro de la placa.
- 4.1.5 Extenderlo sobre el medio realizando movimientos hacia los lados (ver Fig. 1).
- 4.1.6 Deslizar el asa poco a poca hacia abajo para cubrir toda la placa
- 4.1.7 Poner la tapa de la placa de Petri, dejar secar 30 min. antes de invertir la placa.
- 4.1.8 Incubarla las condiciones requeridas.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA SEMBRAR POR EL MÉTODO DE DILUCIÓN  
Y MÉTODO DE AISLAMIENTO POR ESTRÍA**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-03

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 2 DE 2

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			



**4.2 Método de Dilución**

- 4.2.1 Flamear al rojo vivo el asa de inoculación.
- 4.2.2 Enfriar el asa introduciéndola en el agar en que se va a realizar el sembrado.
- 4.2.3 Tomar una asada cargada de la colonia o del medio líquido, según sea la procedencia del inoculo.
- 4.2.4 Poner el inoculo, cerca del borde de la placa y extender sobre el sector A.
- 4.2.5 Flamear el asa y se hace una extensión desde el área A sobre la zona B en estrías paralelas, cuidando de no dejar que se solapen estrías.
- 4.2.6 Flamear el asa y se repite en la zona C y así sucesivamente. (Ver Fig. 2)
- 4.2.7 Poner la tapa de la placa de Petri, dejar secar 30 min. antes de invertir la placa.
- 4.2.8 Incubarla las condiciones requeridas.



**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA SIEMBRA POR TÉCNICA DE VACIADO EN PLACA**

NUMERO DE REVISIÓN _____	CÓDIGO PNO-CM-00-04
FECHA DE REVISIÓN: _____	HOJA 1 DE 1

FIRMA	ELABORO	REVISO	APROBÓ
NOMBRE	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
FECHA			

1.0 OBJETIVO

1.1 Describir la técnica de vaciado en caja para estimar el contenido microbiano de las muestras.

2.0 INTRODUCCIÓN

2.1 Una manera fácil de obtener cultivos puros de los microorganismos es mediante la técnica de vaciado en placa, que permite la formación de colonias discretas incorporadas en el agar por ejemplo, la mayoría de las bacterias, levaduras, muchos hongos y las algas unicelulares, en la que se mezcla el agar fundido, pero enfriado con la alícuota del inóculo.

3.0 MATERIAL Y REACTIVOS

- 3.1 Cajas Petri estériles.
- 3.2 Pipetas estériles.
- 3.3 Medios de cultivo preparados y esterilizados.

4.0 TÉCNICA

- 4.1 En condiciones de esterilidad:
- 4.2 Tomar con una pipeta estéril 1 mL del inóculo.
- 4.3 Vaciar el inóculo en una caja petri estéril.
- 4.4 Adicionar aproximadamente 18 mL del medio esterilizado (mantenido a 45-50°C) en la caja Petri.
- 4.5 Rotar cuidadosamente hasta mezclar el inóculo con el agar uniformemente.
- 4.6 Dejar solidificar y voltear las cajas Petri.
- 4.7 Incubar las cajas el tiempo y a la temperatura indicadas.



**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION  
PARA LA PRUEBA DE LA OXIDASA**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
**PNO-CM-00-05**

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 1 DE 1

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
FECHA			

1.0 OBJETIVO

1.1 Determinar la presencia de la enzima oxidasa para identificar bacterias aeróbicas que pudiesen ser patógenas.

2.0 INTRODUCCIÓN

2.1 La prueba de la oxidasa se basa en la producción bacteriana de la enzima oxidasa. Dicha reacción se debe a la presencia de un sistema de citocromo-oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que actúa a su vez como aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones. Este sistema solo se encuentra en organismos aeróbicos, lo que los hace capaces de utilizar el oxígeno.

3.0 MATERIAL Y REACTIVOS

- 3.1 Palillos planos estériles.
- 3.2 Mechero.
- 3.3 Tiras indicadoras bactident oxidasa.
- 3.4 Solución benzal al 0.001%.

4.0 TÉCNICA

- 4.1 Con un palillo estéril tomar del medio de cultivo una colonia aislada, que haya crecido bien definida.
- 4.2 Aplicar la colonia sobre la zona reactiva de la varilla indicadora y frotar con el asa de inoculación.

5.0 INTERPRETACION DE RESULTADOS

5.1 Al cabo de aproximadamente 20 a 60 segundos los microorganismos oxidasa positivos colorean la zona reactiva de azul a violeta azulado.

6.0 ELIMINACIÓN

6.1 Después de ser usadas las varillas indicadoras, eliminarlas sumergiéndolas en una solución de benzal al 0.001% durante mínimo 6 horas.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA TINCIÓN DE GRAM**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-06

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 1 DE 2

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
<b>FIRMA</b>			
<b>NOMBRE</b>	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
<b>FECHA</b>			

1.0 OBJETIVO

- 1.1 Determinar el grupo bacteriano de las colonias que han crecido en los medios de cultivo, mediante la tinción de su pared celular, para su clasificación e identificación.

2.0 INTRODUCCIÓN

- 2.1 Esta técnica de tinción se utiliza para diferenciar y hacer visible la forma celular así como dar contraste entre las diferentes bacterias involucradas, esto se debe a que los colorantes se combinan químicamente con los componentes de la pared.

3.0 MATERIAL Y REACTIVOS

- 3.1 Portaobjetos.  
3.2 Asa de inoculación.  
3.3 Mechero.  
3.4 Solución de cristal violeta al 1%.  
3.5 Solución yodo-yodurada.  
3.6 Solución de safranina al 2.5%.  
3.7 Solución alcohol acetona.  
3.8 Alcohol al 70%.  
3.9 Solución de benzal al 0.001%.

4.0 TÉCNICA

- 4.1 Limpiar un portaobjetos con alcohol al 70%
- 4.2 Colocar una gota de agua esterilizada con la ayuda de una asa de inoculación flameada
- 4.3 Tomar una asada del microorganismo de interés y resuspender en el portaobjetos, extender la gota formando una capa fina
- 4.4 Aplicar calor suave al portaobjetos con la llama de un mechero de manera paulatina
- 4.5 Enfriar y aplicar sobre el frotis unas gotas de solución de cristal violeta al 1%, dejar actuar un minuto. Lavar con agua y escurrir

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA TINCIÓN DE GRAM**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-06

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 2 DE 2

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
FECHA			

- 4.6 Aplicar unas gotas de la solución yodo-yodurada como mordiente, dejar actuar durante un minuto. Lavar con agua y dejar escurrir.
- 4.7 Agregar unas gotas de alcohol-acetona, durante no más de 10 segundos. Lavar con agua y dejar escurrir.
- 4.8 Aplicar unas cuantas gotas de solución de safranina, dejar actuar entre 15 y 30 segundos. Lavar con agua y dejar escurrir.
- 4.9 Inclinar el portaobjetos para dejar escurrir el exceso de agua y secar los bordes con papel secante.
- 4.10 Observar al microscopio con el objetivo seco débil, seco fuerte y finalmente el de inmersión.

5.0 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- 5.1 Las bacterias Gram positivas, se observan teñidas de color azul violáceo intenso.
- 5.2 Las bacterias Gram negativas se observan de color rojo.

6.0 ELIMINACIÓN

- 6.1 Después de que las laminillas se observaron al microscopio, eliminarlas sumergiéndolas en una solución de benzal al 0.001% durante mínimo 6 horas.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA PRUEBA DE CATALASA**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-07

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 1 DE 1

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
FECHA			

1.0 OBJETIVO

1.1 Determinar la presencia de la enzima catalasa en las colonias de interés, para su identificación y clasificación.

2.0 INTRODUCCIÓN

2.1 La catalasa es una enzima (hemoproteína) que descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Excluyendo a los Streptococcus, la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen a la enzima catalasa.

3.0 MATERIAL Y REACTIVOS

- 3.1 Portaobjetos.
- 3.2 Palillos planos estériles.
- 3.3 Mechero.
- 3.4 Solución oxigenada al 3%.
- 3.5 Solución de benzal al 0.001%.

4.0 TÉCNICA

- 4.1 Tomar con un palillo estéril una colonia sospechosa.
- 4.2 Dispersar sobre la solución oxigenada al 3% en la que previamente colocó sobre un portaobjetos.

5.0 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

5.1 La solución es positiva si se observan burbujas efervescentes del oxígeno desprendido.

6.0 ELIMINACIÓN

6.1 Al término de la prueba sumergir los portaobjetos en una solución de benzal al 0.001% durante mínimo 6 horas.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA PRUEBA DE COAGULASA**

<b>NUMERO DE REVISIÓN</b> _____	<b>CÓDIGO</b> <b>PNO-CM-00-08</b>
<b>FECHA DE REVISIÓN:</b> _____	<b>HOJA 1 DE 2</b>

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
<b>FIRMA</b>			
<b>NOMBRE</b>	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
<b>FECHA</b>			

1.0 OBJETIVO

- 1.1 Demostrar si el microorganismo de interés presenta la enzima coagulasa, mediante la aglutinación del plasma liofilizado, permitiendo identificar a las cepas *Staphylococcus aureus*.

2.0 INTRODUCCIÓN

- 2.1 La enzima de la coagulasa la podemos encontrar de forma libre, para su determinación se utiliza el Método Directo el cual es fácil de realizar y muy definitivo. El BBLTM Coagulase Plasmas es un plasma liofilizado, que ha sido diseñado específicamente para la acción del *Staphylococcus* en las pruebas del Método Directo. Cuando se reconstruya el plasma con el agua estéril, el plasma fluido se coagulará por la acción de la enzima coagulasa.

3.0 MATERIAL, REACTIVOS y EQUIPO

- 3.1 Mechero.
- 3.2 Asa de inoculación.
- 3.3 Tubos estériles.
- 3.4 Pipeta estéril 5mL.
- 3.5 Jeringa desechable 3mL.
- 3.6 Vortex.
- 3.7 Estufa.
- 3.8 Agua destilada.
- 3.9 BBL Coagulasa Plasmas.

4.0 TÉCNICA

- 4.1 Reconstruir el plasma con 3 ml de agua destilada, ayudándose de una jeringa.
- 4.2 Identificar los tubos y distribuir 0.5 mL de plasma en cada tubo estéril, con una pipeta estéril.
- 4.3 Tomar una colonia bien definida con el asa flameada e inocular a cada tubo.
- 4.4 Agitar con la ayuda del vortex, hasta obtener una mezcla completa.
- 4.5 Incubar durante de 3 a 4 horas a 37°C.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA PRUEBA DE COAGULASA**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CODIGO  
PNO-CM-00-08

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 2 DE 2







	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
FECHA			

4.6 Examinar los tubos inclinándolos periódicamente con suavidad. Evitar sacudir o agitarlos, ya que esto podría causar la desintegración del coágulo.

5.0 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

5.1 Cualquier grado de coagulación en 3 o 4 h se considera como un hallazgo positivo.

5.2 La siguiente tabla se puede utilizar como guía para la interpretación de reacciones.

Negativo	Positivo			
	1+	2+	3+	4+
				 

6.0 ELIMINACIÓN

6.1 Sumergir el material utilizado en una solución de benzal al 0.001% durante 6 horas.

6.2 Al terminar la prueba, todos los tubos inoculados deben pasar por un tratamiento de esterilización durante 15 minutos a 120°C y 14 lb de presión.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA PRUEBA DE COAGULASA**

NUMERO DE REVISIÓN _____	CÓDIGO PNO-CM-00-09
FECHA DE REVISIÓN: _____	HOJA 1 DE 2

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
<b>FIRMA</b>			
<b>NOMBRE</b>	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
<b>FECHA</b>			

1.0 OBJETIVO

- 1.1 Distinguir si un microorganismo tiene afinidad por el fibrinógeno, por medio de aglutinación de partículas de látex y eritrocitos para la identificación de *Staphylococcus aureus*.

2.0 INTRODUCCIÓN

- 2.1 Esta prueba se basa en la capacidad de las cepas de *Staphylococcus aureus* para producir la enzima coagulasa extracelular que coagula el plasma de conejo. Eritrocitos de cordero estabilizados, sensibilizados por un fibrinógeno, son aglutinados cuando se les pone en presencia de una cepa de *Staphylococcus aureus* portadora de ese receptor.

3.0 MATERIAL Y REACTIVOS

- 3.1 Mechero.
- 3.2 Portaobjetos.
- 3.3 Asa de inoculación.
- 3.4 Vortex.
- 3.6 Slidex Staph -Kit reactivo R1 y R2.
- 3.7 Solución de benzal al 0.001%.

4.0 TÉCNICA

- 4.1 Identificar las colonias sospechosas, provenientes de un cultivo joven (18-24 horas).
- 4.2 Resuspender bien los reactivos los cuales deberán estar a temperatura ambiente. Eliminar las gotas retenidas en el cuentagotas y mezclar bien.
- 4.3 En un portaobjetos limpio, depositar en 2 círculos:
  - a) 1 gota de reactivo anti-*Staphylococcus aureus* (R1)
  - b) 1 gota de reactivo de control (R2)
- 4.4 Tomar con el asa flameada de 1 a 2 colonias sospechosas y en cada reactivo dispérsalas
- 4.4 Dar a la lamina un leve movimiento de rotación durante 20 segundos.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA PRUEBA DE COAGULASA**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-09

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 2 DE 2

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
FECHA			

5.0 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- 5.1 Un **resultado positivo** es indicado por la aparición en el reactivo R1 de una aglutinación dentro de 30 segundos (tiempo mezcla + tiempo de rotación de la lámina), ya sea de eritrocitos sensibilizados (coloración roja) o de partículas de látex (coloración blanca), o de ambos simultáneamente (coloración rojo anaranjado)
- 5.2 Un **resultado negativo** es indicado por una suspensión homogénea (R1 y R2)
- 5.3 Algunas cepas pueden ser difíciles de emulsionar y forman grumos o filamentos en el reactivo. Estas imágenes no deben confundirse con una aglutinación. Sin embargo, una aglutinación puede ser visible entre los grumos.

6.0 ELIMINACIÓN

- 6.1 Sumergir el material utilizado en una solución de benzal al 0.001% durante 6 horas como mínimo.
- 6.2 Preferentemente esterilizar durante 15 min. todo el material contaminado en autoclave a 120°C y 15lb.



**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA IDENTIFICACIÓN DE STAPHYLOCOCCUS**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-10

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 1 DE 3

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
<b>FIRMA</b>			
<b>NOMBRE</b>	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
<b>FECHA</b>			

1.0 OBJETIVO

1.1 Identificar al género Staphylococcus y sus especies, mediante tests bioquímicos, estandarizados y miniaturizados.

2.0 INTRODUCCIÓN

2.1 Los diferentes tests de la galería se presentan en forma deshidratada. Su reconstitución se realiza añadiendo a cada tubo, API STAPH Médium inoculado con la cepa a estudiar, que previamente se ha debido cultivar en un medio apropiado.

3.0 MATERIAL Y REACTIVOS

3.1 Kit para API Staph.

3.2 Software de Identificación.

3.3 Aceite de Parafina.

3.4 Reactivos  
     VP1  
     VP2  
     NIT1  
     NIT2  
     ZYM A  
     ZYM B

3.5 Tubo de McFarland Standard 0.5.

3.6 Pipetas estériles.

3.7 Asa de inoculación.

3.8 Estufa a 35-37°C.

3.9 Mechero Bunsen.

3.10 Rotulador.

3.11 Solución sanitizadora.

4.0 TÉCNICA

4.1 **Tratamiento de las muestras**

4.1.1 Los microorganismos a identificar deben aislarse y ser puros, en un primer tiempo, sobre un medio de cultivo adecuado como agar sangre durante 18-24 horas no más.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA IDENTIFICACIÓN DE STAPHYLOCOCCUS**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-10

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 2 DE 3

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
<b>FIRMA</b>			
<b>NOMBRE</b>	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
<b>FECHA</b>			

**4.2 Preparación de la galería**

- 4.2.1 Unir el fondo y la tapa de una cámara de incubación .
- 4.2.2 Con una pipeta estéril repartir en los alvéolos aproximadamente 5 ml de agua destilada, o desmineralizada (o cualquier agua sin aditivos o derivados susceptibles de liberar gases) con el fin de crear una atmósfera húmeda.
- 4.2.3 Inscribir la referencia de la cepa en la lengüeta lateral de la cámara.
- 4.2.4 Sacar la galería de su bolsa hermética.
- 4.2.5 Poner la galería en la cámara.

**4.3 Preparación del inóculo**

- 4.3.1 Verificar que la cepa pertenece a la familia de los Micrococcaceae (cocos en racimos, Gram+, Catalasa+), así como su pureza (que en el medio de cultivo solo se encuentre un solo tipo de microorganismo).
- 4.3.2 Abrir una ampolla de API STAPH Médium.
- 4.3.3 Con el asa de inoculación tomar las colonias necesarias hasta igualar la turbidez equivalente al tubo 0.5 de MacFarland, homogenizar la suspensión utilizando el vortex.

**4.5 Inoculación de la Galería**

- 4.5.1 Rellenar los tubos de la galería con la suspensión preparada con API STAPH médium, utilizando una pipeta estéril. Llenar solo los tubos no las cúpulas, sin sobrepasar el nivel del tubo.
- 4.5.2 Crear anaerobiosis en los tests ADH (Arginina) y URE (Urea) rellenando la cúpula con aceite de parafina estéril para formar un menisco convexo.
- 4.5.3 Cerrar la cámara de incubación.
- 4.5.4 Incubar a 35-37°C durante 18-24 horas.

**5.0 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

**5.1 Lectura de la galería**

- 5.1.1 Leer todas las reacciones espontáneas conforme a la Tabla de Lectura API STAP

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESTAPHYLOCOCCUS**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
**PNO-CM-00-10**

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA **3** DE **3**

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
FECHA			

5.1.2 Revelar los ensayos que necesitan de la adición de reactivos:

**Tests VP: VP 1 y VP 2.** Producción de Acetil-métíl-carbinol.

Agregar una gota de cada reactivo. Esperar 10 minutos. Un color rosa fuerte o violeta indica una reacción positiva. Un color rosa pálido o rosa claro obtenido después de 10 minutos debe ser considerado negativo.

**Tests NIT: NIT 1 y NIT 2.** Reducción de Nitratos a Nitritos.

Agregar una gota de cada reactivo. Esperar 10 minutos. Una coloración roja indica una reacción positiva.

**Test PAL: ZYM A y ZYM B.** Fosfatasa Alcalina

Agregar una gota de cada reactivo. Esperar 10 minutos. Una coloración violeta indica una reacción positiva.

5.1.3 Anotar los resultados en la hoja de resultados. Ver Anexo I

## 6.0 IDENTIFICACIÓN

6.1 La identificación se obtiene a partir del perfil numérico:

6.1.1 En la hoja de resultados, los tests están separados en grupos de tres y un valor 1, 2 o 4 se indica para cada uno, sumando en el interior de cada grupo de los valores correspondientes a las reacciones positivas, se obtienen 7 cifras que constituyen el perfil numérico.

6.2 Con la ayuda del programa informático para identificación, introducir manualmente con el teclado el perfil numérico de 7 cifras.

6.3 La prueba de lisostafina característica de los Micrococcos, constituye el tests no 21 y se le adjudica el valor 4 cuando es positiva.

## 7.0 ELIMINACIÓN

7.1 Al terminar la prueba, después de la lectura e interpretación, todas las muestras, objetos contaminados y productos inoculados deben sumergirse en solución desinfectante o bien ser sometidos a esterilización en autoclave.

## ANEXO I

### TABLA DE IDENTIFICACIÓN API Staph

TESTS	SUBSTRATOS	RESULTADOS	
		NEGATIVO	POSITIVO
0	Ninguno	Rojo	-
GLU FRU MNE MAL LAC TRE MAN XLT MEL	D-Glucosa D-Fructosa D-Manosa Maltosa Lactosa D-Trehalosa D-Manitol Xilitol D-Melibiosa	ROJO	AMARILLO
NIT	Nitrato de Potasio	NIT 1 + NIT 2 / 10 min.	
PAL	$\beta$ -naftil fosfato	Incolora-rosa pálido	Rojo
VP	Piruvato de Sodio	ZYM A + ZYM B / 10 min.	
RAF XYL SAC MDG NAG	Rafinosa Xilosa Sacarosa $\alpha$ -metil-D-Glucosa N-acetil-glucosa	Amarillo	Violeta
ADH	Arginina	VP 1 + VP 2 / 10 min.	
URE	UREA	Incoloro-rosa pálido	Violeta-Rosa
		ROJO	AMARILLO
		AMARILLO	NARANJA-ROJO
		AMARILLO	ROJO-VIOLETA

## ANEXO II: HOJA DE RESULTADOS API Staph

REF:   _____	
ORIGEN: _____	

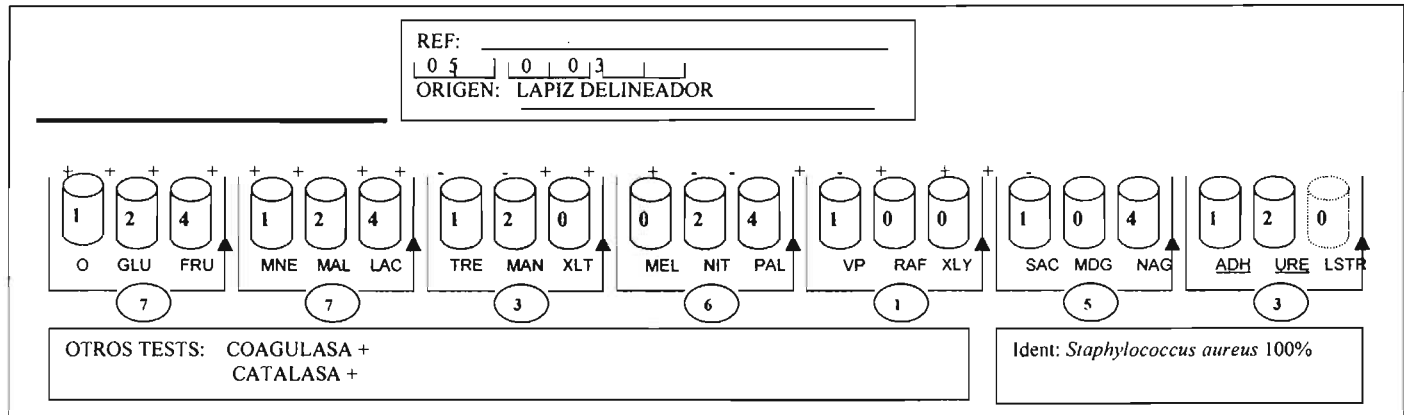
  

1 O	2 GLU	4 FRU	1 MNE	2 MAL	4 LAC	1 TRE	2 MAN	4 XLT	1 MEL	2 NIT	4 PAL	1 VP	2 RAF	4 XLY	1 SAC	2 MDG	4 NAG	1 ADH	2 URE	4 LSTR
--------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	---------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	-----------

OTROS TESTS: \_\_\_\_\_

Ident: \_\_\_\_\_

### ANEXO III: EJEMPLO DE *Staphylococcus aureus*



PERFIL NUMERICO: 7736153

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACILOS GRAM NEGATIVOS  
NO ENTERO-BACTERIAS**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-11

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 1 DE 4

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
FECHA			

1.0 OBJETIVO

- 1.1 Identificar al género de los Bacilos Gram. negativos no entero-bacterias y no fastidiosos mediante un sistema estandarizado que consta de tests bioquímicos miniaturizados.

2.0 INTRODUCCIÓN

- 2.1 La galería API 20 NE incluyen 20 microtubos que contienen substratos deshidratados. Los ensayos convencionales se inoculan con una suspensión bacteriana salina que reconstituye los medios. Las reacciones que se producen durante la incubación se traducen en cambios de color, ya sea espontáneos o bien, provocados por la adición de reactivos. Los ensayos de asimilación se inoculan con un medio mínimo y las bacterias crecen solamente si son capaces de utilizar el correspondiente substrato.

3.0 MATERIAL Y REACTIVOS

- 3.1 Kit API 20 NE.
- 3.2 API CINA 0.85% Médium, 2 ml.
- 3.3 Reactivo James.
- 3.4 Reactivo NIT 1 + NIT 2.
- 3.5 Reactivo Zn.
- 3.6 Aceite de parafina estéril.
- 3.7 Tubo de McFarland Standard 0.5.
- 3.8 Pipetas estériles.
- 3.9 Asa de inoculación.
- 3.10 Estufa a 29°C.
- 3.11 Solución sanitizadora.
- 3.12 Software de identificación.

4.0 TÉCNICA

- 4.1 **Tratamiento de las muestras**
- 4.1.1 Los microorganismos a identificar deben aislarse, en un primer tiempo, sobre un medio de cultivo adecuado como agar soya tripticaseína durante 18-24 horas no más.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACILOS GRAM NEGATIVOS  
NO ENTERO-BACTERIAS**

NUMERO DE REVISIÓN _____	CÓDIGO <b>PNO-CM-00-11</b>
FECHA DE REVISIÓN: _____	<b>HOJA 2 DE 4</b>

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
<b>FIRMA</b>			
<b>NOMBRE</b>	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
<b>FECHA</b>			

**4.2 Tests de la Oxidasa**

4.2.1 Debe realizarse antes de comenzar la prueba, y constituye el tests de identificación no. 21 anotar en la hoja de resultados. Ver PNO-CM-00-05.

**4.3 Preparación de la galería**

4.3.1 Reunir el fondo y tapa de una cámara de incubación y repartir aproximadamente 5 ml de agua destilada o desmineralizada en los alvéolos para crear una atmósfera húmeda.

4.3.2 Inscribir la referencia de la cepa en la lengüeta lateral de la cámara.

4.3.3 Sacar una galería de su envase individual.

4.3.4 Colocar la galería en la cámara de incubación.

**4.4 Preparación del inóculo**

4.4.1 Abrir una ampolla de API NaCl 0.85% médium (2ml).

4.4.2 Con la ayuda de una asa de inoculación estéril, tomar de 1 a 4 colonias de idéntica morfología.

4.4.3 Realizar una suspensión de turbidez igual a 0.5 de McFarland.

**4.5 Inoculación de la Galería**

4.5.1 Rellenar los tubos (y no las cúpulas) de los ensayos desde el NO3 al PNPG con la suspensión precedente utilizando una pipeta estéril.

4.5.2 Abrir una ampolla de API AUX médium y transferir a ella 200ul de la suspensión precedente. Homogenizar con la pipeta evitando la formación de burbujas.

4.5.3 Rellenar los tubos y las cúpulas de los ensayos desde el GLU al PAC teniendo cuidado de que se cree un menisco horizontal o ligeramente convexo pero jamás cóncavo.

4.5.4 Rellenar con aceite de parafina estéril las cúpulas de los tres ensayos GLU, ADH, URE para formar un menisco convexo.

4.5.5 Volver a cerrar la cámara de incubación e incubar a 29°C ±2°C durante 24 horas (± 2 horas).



**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACILOS GRAM NEGATIVOS  
NO ENTERO-BACTERIAS**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-11

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 3 DE 4

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
<b>FIRMA</b>			
<b>NOMBRE</b>	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
<b>FECHA</b>			

**5.0 LECTURA DE RESULTADOS**

**5.1 Lectura de la galería**

5.1.1 Después de inocular, la lectura de la galería debe realizarse con relación a la Tabla de Identificación.

5.1.2 Anotar en la hoja de resultados las reacciones espontáneas (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPB).

5.1.3 El Revelado de los dos ensayos NO<sub>3</sub> y TRP debe realizarse protegiendo los ensayos de asimilación con la tapa de la cámara de incubación, para evitar una contaminación aérea.

**5.2 Ensayo NO<sub>3</sub>. Reducción de Nitratos a Nitritos.**

5.2.1 Añadir una gota del reactivo NIT 1 y NIT 2 en la cúpula NO<sub>3</sub>.

5.2.2 Pasados 5 minutos, la aparición de un color rojo nos indicará una reacción positiva. Anotar en la hoja de resultados. Si la cúpula adquiere una coloración rosa-rojo, la reacción es negativa pues los nitratos

5.2.3 Una reacción negativa puede deberse a la producción de nitrógeno (eventualmente señalado por la presencia de microburbujas); añadir 2-3 mg de reactivo de Zn en la cúpula NO<sub>3</sub>.

5.2.4 Pasados 5 minutos, una cúpula incolora nos indica una reacción positiva que anotaremos en la hoja de resultados. Si la cúpula adquiere una coloración rosa-rojo, la reacción es negativa pues los nitratos aún presentes en el tubo se han reducido entonces en nitritos por la acción del zinc.

**5.3 Ensayo TRP. Formación de Triptofano.**

5.3.1 Añadir una gota de reactivo James. La difusión en toda la cúpula de un color rosa nos indica una reacción positiva.

**5.4 Ensayo de Asimilación**

5.4.1 Observar el crecimiento bacteriano. Una cúpula turbia nos indica una reacción positiva.

5.4.2 Los brotes de intensidad media pueden observarse y anotarse como ±.

5.4.3 Llevar a cabo la identificación.

**5.5 En los siguientes casos es necesaria una reincubación:**

5.5.1 Si el perfil no se encuentra en el Software de Identificación de API 20 NE.

5.5.2 Si el perfil obtenido nos indica la siguiente nota:

**IDENTIFICACIÓN NO VALIDA ANTES DE 48 HORAS DE INCUBACIÓN**

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACILOS GRAM NEGATIVOS  
NO ENTERO-BACTERIAS**

NUMERO DE REVISIÓN _____	CÓDIGO PNO-CM-00-11
FECHA DE REVISIÓN: _____	HOJA 4 DE 4

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
FECHA			

- 5.6 **Reincubación**  
5.6.1 Con la ayuda de una pipeta estéril aspirar los reactivos NIT 1, NIT 2 y James.
- 5.6.2 Recubrir inmediatamente los ensayos NO3 y TRP con aceite de parafina formando un menisco convexo.
- 5.6.3 Incubar a 29°C±2°C y después de 24 H leer, salvo los tres primeros ensayos NO3, TRP y GLU.
- 6.0 **INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:**
- 6.1 La identificación se obtiene a partir del perfil numérico.
- 6.1.1 En la hoja de resultados, los tests están separados en grupos de 3 y se asignara para cada uno un valor 1, 2 ó 4. Ver Anexo I.
- 6.1.2 Sumar en el interior de cada grupo los números que corresponden a reacciones positivas. Se obtendrá 7 cifras.
- 6.1.3 A la reacción de la oxidasa que constituye el ensayo no 21, se le asignara el valor 4 cuando resulte positiva.
- 6.2 **Identificación**
- 6.2.1 Por medio del software de identificación, introducir manualmente por teclado el perfil numérico de 7 cifras.
- 7.0 **ELIMINACIÓN**
- 7.1 Al terminar la prueba, después de la lectura e interpretación, todas las muestras, objetos contaminados y productos inoculados deben sumergirse en solución desinfectante o bien ser sometidos a esterilización en autoclave.

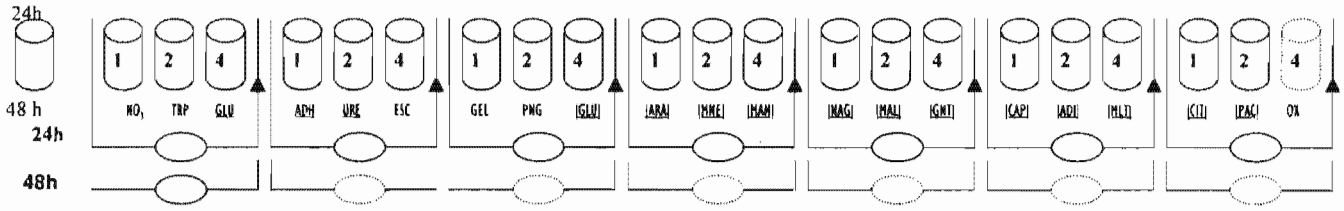
## ANEXO I

### TABLA DE IDENTIFICACIÓN API® 20 NE

TESTS	COMPONENTES ACTIVOS	RESULTADOS	
		POSITIVO	NEGATIVO
NO <sub>3</sub>	Nitrate de potasio	NIT 1 + NIT 2 / 5 min	
		Incoloro	rosa-rojo
TRP	L-triptofano	Zn/5 min	
		Rosa	Incoloro
		James/ inmediato	
		Incoloro Verdepálido Amarillo	Rosa
GLU	D-Glucosa	Azul a verde	Amarillo
ADH	L-arginina	Amarillo	Naranja/rosa/rojo
URE	Urea	Amarillo	Naranja/rosa/rojo
ESC	Esculina citrato ferrico	Amarillo	Gris/marrón/negro
GEL	Gelatina (origen bovino)	Sin difusión Del pigmento	Difusión del pigmento negro
PNPG	4-nitrofenil-βD- galactopiranosida	Incoloro	Amarillo
<u>GLU</u>	D-glucosa	Transparencia	Turbio
<u>ARA</u>	L-arabinosa	Transparencia	Turbio
<u>MNE</u>	D-manosa	Transparencia	Turbio
<u>MAN</u>	D-manitol	Transparencia	Turbio
<u>NAG</u>	N-acetil-glucosamina	Transparencia	Turbio
<u>MAL</u>	D-maltosa	Transparencia	Turbio
<u>GNT</u>	Gluconato potásico	Transparencia	Turbio
<u>CAP</u>	Ácido capricho	Transparencia	Turbio
<u>ADI</u>	Ácido adípico	Transparencia	Turbio
<u>MLT</u>	Ácido málico	Transparencia	Turbio
<u>CIT</u>	Citrato trisódico	Transparencia	Turbio
<u>PAC</u>	Ácido fenilacético	Transparencia	Turbio
OX	Ver procedimiento prueba de la oxidasa		

## ANEXO II: HOJA DE RESULTADOS API 20 NE

REF: I \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 ORIGIN: \_\_\_\_\_



OTROS TESTS: \_\_\_\_\_

Ident: \_\_\_\_\_



**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA IDENTIFICACIÓN BACILOS GRAM NEGATIVOS  
Y ENTERO-BACTERIAS**

<b>NUMERO DE REVISIÓN</b> _____	<b>CÓDIGO</b> <b>PNO-CM-00-12</b>
<b>FECHA DE REVISIÓN:</b> _____	<b>HOJA 1 DE 4</b>

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
<b>FIRMA</b>			
<b>NOMBRE</b>	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
<b>FECHA</b>			

**1.0 OBJETIVO**

1.1 Identificar al género Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram negativos no exigentes, mediante un sistema estandarizado que consta de tests bioquímicos miniaturizados.

**2.0 INTRODUCCIÓN**

2.1 La galería del sistema API 20 E se compone de 20 microtubos que contienen los substratos deshidratados. Los microtubos se inoculan con una suspensión bacteriana que reconstituye los tests. Las reacciones producidas durante el período de incubación se traducen en cambios de color espontáneos o revelados mediante la adición de reactivos.

**3.0 MATERIAL Y REACTIVOS**

- 3.1 Kit API 20 E.
- 3.2 API NaCl 0.85% Médium, 5 ml.
- 3.3 Reactivo TDA.
- 3.4 Reactivo James.
- 3.5 Reactivo VP 1 + VP 2.
- 3.6 Reactivo NIT 1 + NIT 2.
- 3.7 Reactivo Zn.
- 3.8 Reactivo para la prueba de oxidasa.
- 3.9 Aceite de parafina.
- 3.10 Pipetas estériles.
- 3.11 Asa de inoculación.
- 3.12 Estufa a 29°C.
- 3.13 Solución sanitizadora.
- 3.14 Software de identificación.

**4.0 TÉCNICA**

**4.1 Tratamiento de las muestras**

4.1.1 Los microorganismos a identificar deben aislarse, en un primer tiempo, sobre un medio de cultivo adecuado como Agar Soya tripticaseína durante 18-24 horas no más.

**4.2 Tests de la Oxidasa**

4.2.1 El tests de la oxidasa constituye el tests de identificación No. 21 anotar el resultado en la hoja de resultados.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACILOS GRAM NEGATIVOS  
Y ENTERO-BACTERIAS**

NUMERO DE REVISIÓN _____	CÓDIGO <b>PNO-CM-00-12</b>
FECHA DE REVISIÓN: _____	HOJA <b>2</b> DE <b>4</b>

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
<b>FIRMA</b>			
<b>NOMBRE</b>	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
<b>FECHA</b>			

**4.3 Preparación de la galería**

4.3.1 Reunir fondo y tapa de una cámara de incubación .

4.3.2 Repartir aproximadamente 5ml de agua destilada o desmineralizada en los alvéolos para crear una atmósfera húmeda.

4.3.3 Inscribir la referencia en la lengüeta lateral de la cámara.

4.3.4 Sacar la galería de su envase.

4.3.5 Colocar la galería en la cámara.

**4.4 Preparación del inóculo**

4.4.1 Abrir una ampolla de API NaCl 0.85% Médium (5 ml) o una ampolla de API Suspensión Médium (5ml), o utilizar un tubo que contenga 5 ml de agua fisiológica estéril o de agua destilada estéril, sin aditivos.

4.4.2 Con una asa de inoculación flameada, tomar una colonia bien aislada de un cultivo joven (18-24 horas).

4.4.3 Realizar una suspensión bacteriana homogenizando las bacterias en el medio con la ayuda de un vortex.

**4.5 Inoculación de la Galería**

4.5.1 Llenar los tubos y las cúpulas de los ensayos CIT, VP, GEL con la suspensión bacteriana, utilizando una pipeta estéril.

4.5.2 Llenar únicamente los tubos y no las cúpulas de los otros ensayos.

4.5.3 Llenar la cúpula de los ensayos:ADH, LDC, ODC, H2S, URE, con aceite mineral para crear anaerobiosis.

4.5.4 Cerrar la cámara de incubación.

4.5.5 Incubar a 36°C durante 18-24 horas.

**5.0 LECTURA DE RESULTADOS**

**5.1 Lectura de la galería**

5.1.1 Leer la galería después de la incubación haciendo referencia a la Tabla de Lectura API 20 E.

5.1.2 En caso de que 3 o más ensayos resulten positivos, anotar en la hoja de resultados todas las reacciones espontáneas. Ver Anexo I

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO OPERACIÓN  
PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACILOS GRAM NEGATIVOS  
Y ENTERO-BACTERIAS**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-12

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 3 DE 4

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
FECHA			

5.1.3 Revelar los ensayos que requieren adición de reactivos:

5.2 **Prueba TDA.** Triptofano Des-amonasa

5.2.1 Agregar una gota de reactivo TDA. Un color marrón-rojizo indica una reacción positiva que se anotará en la hoja de resultados.

5.2.2 **Prueba VP.** Producción de Acetoina

Agregar una gota de reactivo VP 1 y VP2. Esperar un mínimo de 10 minutos. Un color rosa o rojo indica una reacción positiva que se anotará en la hoja de resultados. Una débil coloración rosa que aparece después de 10 minutos debe ser considerada como negativa.

5.3 **Prueba IND.** Producción de Indol.

Agregar 1 gota del reactivo JAMES. Un color Rosado que se difumina en toda la cúpula indica una reacción positiva, que se debe anotar en la hoja de resultados. Esta prueba debe realizarse en ultimo lugar.

5.4 Si el número de pruebas positivas antes de añadir los reactivos (incluyendo el ensayo GLU) es inferior a 3:

5.4.1 Reincubar la galería 24 horas ( $\pm$  2 horas), sin volver a añadir los reactivos.

5.4.2 Revelar los ensayos que requieren la adición de reactivos.

## 6.0 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

6.1 **La identificación se obtiene a partir del perfil numérico:**

6.1.1 En la hoja de resultados, los tests están separados en grupos de tres y se indica para cada uno valores de 1, 2 ó 4. Como la galería API 20 E comporta 20 ensayos, sumando al interior de cada grupo los valores que corresponden a reacciones positivas, se obtiene un perfil numérico de 7 cifras. Ver Anexo

6.1.2 A la reacción de la oxidasa que constituye el test no 21 se le asigna el valor 4, cuando resulte positiva.

6.2 **Identificación**

6.2.1 Se realiza a partir de la base de datos (V4.0).

Con la ayuda del software de identificación, introducir manualmente el perfil numérico de 7 cifras, si se realiza alguna prueba complementaria aumentara el número de cifras a 8 o 9 cifras.



**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACIOS GRAM NEGATIVOS  
Y ENTEROBACTERIAS**

<b>NUMERO DE REVISIÓN</b> _____	<b>CÓDIGO PNO-CM-00-12</b>
<b>FECHA DE REVISIÓN:</b> _____	<b>HOJA 4 DE 4</b>

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
<b>FIRMA</b>			
<b>NOMBRE</b>	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
<b>FECHA</b>			

**6.3 Ensayos complementarios**

En caso que el perfil de 7 cifras resulta insuficientemente discriminante, se realizan los siguiente ensayos complementarios:

6.3.1 Reducción de los nitratos en nitritos (NO<sub>2</sub>) y en nitrógeno (N<sub>2</sub>):

6.3.1.1 Añadir una gota de los reactivos NIT 1 y NIT 2 en el tubo GLU. Esperar de 2 a 5 minutos. Una coloración roja indica una reacción positiva (NO<sub>2</sub>). Una reacción negativa (coloración amarilla) puede de verse a la producción de nitrógeno.

6.3.1.2 Agregar de 2 a 3 mg de reactivo Zn en la cúpula GLU. Después de 5 minutos , si el color sigue siendo amarillo, indica una reacción positiva (NO<sub>2</sub>), anotar en la hoja de resultados. Si el color de la cúpula cambia a naranja-rojo, la reacción es negativa.

**7.0 ELIMINACIÓN**

7.1 Al terminar la prueba, después de la lectura e interpretación, todas las muestras, objetos contaminados y productos inoculados deben sumergirse en solución desinfectante o bien ser sometidos a esterilización en autoclave.

## ANEXO I

### TABLA DE IDENTIFICACIÓN API® 20 E

TESTS	COMPONENTES ACTIVOS	RESULTADOS	
		NEGATIVO	POSITIVO
ONPG	2-nitro-fenil-βD-galactopiranosida	Incoloro	Rosa
<u>ADH</u>	L-arginina	Amarillo	Rosa
<u>LCD</u>	L-lisina	Amarillo	Rosa
<u>ODC</u>	L-ornitina	Amarillo	Rosa
<u>CIT</u>	Citrato trisódico	Verde/pálido-amarillo	Rosa
<u>H<sub>2</sub>S</u>	Tiosulfato sódico	Incoloro/grisáceo	Rosa
<u>URE</u>	Urea	Amarillo	Rosa
TDA	L-tritófano	TDA/inmediato	
IND	L-triptófano	Amarillo	Marrón-Rojizo
		James / inmediato	
<u>VP</u>	Piruvato sódico	Incoloro	Rosa
		Verde pálido/amarillo	
<u>VP</u>	Piruvato sódico	VP 1 +VP2 / 10 min	
<u>GEL</u>	Gelatina (origen bovino)	Incoloro	rosa/rojo
<u>GEL</u>	Gelatina (origen bovino)	No difusión	Difusión pigmento negro
GLU	D-glucosa	Azul/azul verdoso	Amarillo / amarillo grisáceo
MAN	D-manitol	Azul/azul verdoso	Amarillo
INO	Inositol	Azul/azul verdoso	Amarillo
SOR	D-sorbitol	Azul/azul verdoso	Amarillo
RHA	L-ramnosa	Azul/azul verdoso	Amarillo
SAC	D-sacarosa	Azul/azul verdoso	Amarillo
MEL	D-melibiosa	Azul/azul verdoso	Amarillo
AMY	Amigbalina	Azul/azul verdoso	Amarillo
ARA	L-arabinosa	Azul/azul verdoso	Amarillo
OX	Ver metodos		

## ANEXO II: HOJA DE RESULTADOS 20 E

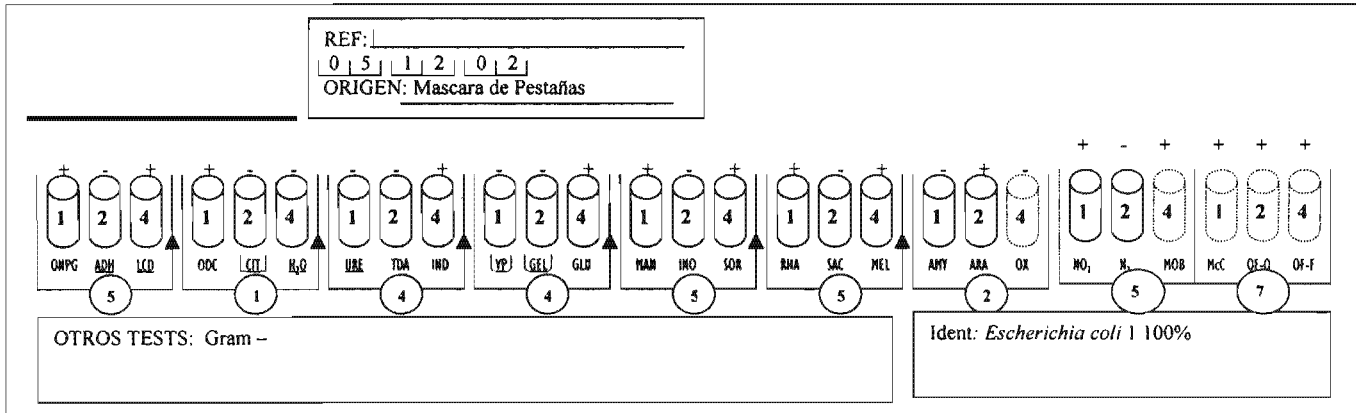
REF: \_\_\_\_\_  
ORIGEN: \_\_\_\_\_

1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4									
ONPG	ADH	LED	ODC	CIT	H <sub>2</sub> O	UBA	YDA	IND	YPJ	GEL	GLU	HAN	IRO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> S	MOB	McC	OF-D	OF-F			
○			○			○			○			○			○			○			○			○			○		

OTROS TESTS:

Ident:

### ANEXO III: EJEMPLO DE *Escherichia coli* 1



PERFIL NUMERICO: 514455257

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA TOMA DE MUESTRA DEL MEDIO AMBIENTE**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-13

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 1 DE 1

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
<b>FIRMA</b>			
<b>NOMBRE</b>	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
<b>FECHA</b>			

1.0 OBJETIVO

- 1.1 Obtener una muestra representativa del medio ambiente de las diferentes áreas de producción, para realizar un ensayo de cuenta bacteriana y determinar si la calidad de este es aceptable para que se lleve a cabo la producción de cosméticos sin riesgo a que sean contaminados.

2.0 INTRODUCCIÓN

- 2.1 Las paredes, instalaciones eléctricas, de gas y aire, y el flujo del personal, liberan partículas que pueden estar suspendidas en el aire, dichas partículas pueden ser captadas por placas de agar expuestas.

3.0 MATERIAL Y REACTIVOS

- 3.1 Placas de agar soya triptícaseína.  
3.2 Placas de agar papa dextrosa.  
3.3 Marcador indeleble.  
3.4 Cronometro.

4.0 TÉCNICA

- 4.1 Fijar los puntos críticos del área a monitorear.  
4.2 Colocar una placa de agar soya triptícaseína y una de agar papa dextrosa de identificada, en cada punto.  
4.3 Dejar las placas a exposición durante 20 minutos.  
4.4 Pasado el tiempo cerrar la caja y llevar a incubar las durante 24 H a 33°C.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA TOMA DE MUESTRA DEL EQUIPO DE TRABAJO**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-14

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 1 DE 1

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
FECHA			

1.0 OBJETIVO

- 1.1 Realizar un muestreo del equipo de trabajo para evaluar la efectividad de su limpieza y sanitización, empleando un ensayo de cuenta bacteriana.

2.0 INTRODUCCIÓN

- 2.1 La limpieza y sanitización del equipo después de ser utilizado puede resultar difícil, ya sea que el diseño lo impida o el material del que esta fabricado no es el adecuado, una forma de evaluarlo es extrayendo una muestra por hisopado que permite alcanzar los rincones inaccesibles.

3.0 MATERIAL Y REACTIVOS

- 3.1 Kit Spec -Sponge.

4.0 TÉCNICA

- 4.1 Identificar la zona de muestreo de cada equipo de 20 a 30 cm2.
- 4.2 Rotular la bolsa con la información necesaria.
- 4.3 Rasgar la bolsa a lo largo de la perforación y separar el contenedor de la esponja, y el de los guantes.
- 4.4 Rasgar por encima de la bolsa que contiene la esponja a lo largo de la perforación.
- 4.5 Jalar cada una de las tiras hacia los lados para abrir.
- 4.6 Adicionar el caldo de neutralizador y humedecer la esponja.
- 4.7 Conducir la esponja por el exterior hacia arriba de la bolsa.
- 4.8 Sacar los guantes por el extremo de la muñeca y sacudir para desplegar y colocárselos.
- 4.9 Con el guante en la mano, sacar la esponja.
- 4.10 Limpiar la superficie a monitorear y regresar la esponja a la bolsa.
- 4.11 Quitarse los guantes y cerrar la bolsa por arriba doblando tres veces y sujetar con los alambres laterales.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA TOMA DE MUESTRA DEL PERSONAL**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
**PNO-CM-00-15**

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 1 DE 1

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
FECHA			

1.0 OBJETIVO

1.1 Efectuar un muestreo de los operadores que intervienen en la fabricación de los cosméticos, llevando a cabo un hisopado en manos y ropa, para evaluar los niveles de contenido microbiano del operario.

2.0 INTRODUCCIÓN

2.1 Una de las principales fuentes de contaminación es ocasionada por el personal que opera, debido a su contacto frecuente y directo con el producto, la contaminación que puede provocar el hablar, toser o estornudar directamente sobre el producto es necesario conocerla y evaluarla.

3.0 MATERIAL Y REACTIVOS

3.1 Kit SRK Swab. Rinse.

3.2 Placas de agar soya tripticaseína.

4.0 TÉCNICA

4.1 **Kit SRK Swab. Rinse**

4.1.1 Identificar la zona a hisopar en la ropa o pida que expongan sus manos del personal a monitorear.

4.1.2 Abrir la bolsa estéril y extraer el hisopo.

4.1.3 Humedecer el hisopo con la solución isotónica y frotar sobre la superficie delimitada.

4.1.4 Introducir el hisopo en el tubo que contiene la solución isotónica, romper el aplicador del hisopo y cerrar el tubo.

4.1.5 Transportar la muestra al laboratorio de microbiología.

4.2 **Placas de agar soya tripticaseína**

4.2.1 Abrir la caja y pedir que el operario abra su boca y tosa directamente sobre la placa de agar.

4.2.1 Cerrar la caja, llevar al Laboratorio de Microbiología y incubar a 37°C durante 24 horas.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA EL MONITOREO DEL PROCESO DE ESTERILIZACIÓN  
POR CALOR HÚMEDO**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-16

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 1 DE 2

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
FECHA			

1.0 OBJETIVO

1.1 Determinar la eficiencia del proceso de esterilización por calor húmedo, realizando un monitoreo con indicadores biológicos.

2.0 INTRODUCCIÓN

2.1 SporAmpule es un bioindicador para esterilización en autoclave. Cada SporAmpule contiene Bacillus Stearothermophilus ATCC: 7953 esporas, suspendidas en un medio de cultivo que contiene púrpura bromocresol como indicador de pH. La producción de ácido durante el crecimiento de la bacteria cambia de color púrpura a color amarillo ayudando a la detección de crecimiento.

Durante el ciclo de esterilización los microorganismos están expuestos a una atmósfera húmeda y sujetos a temperatura creciente, estos morirán en el punto donde se da la coagulación de sus proteínas.

Para la destrucción de las esporas bacterianas el vapor se condensa sobre sus paredes y aumenta su contenido de agua, provocando hidrólisis y ruptura de proteínas, esta acción se logra si el procedimiento esterilización es el adecuado.

3.0 MATERIAL Y REACTIVOS

3.1 3 Ampolletas SporAmpule.  
3.2 Estufa a 56°C.

4.0 TÉCNICA

- 4.1 Colocar dos o mas ampolletas en cada nivel del autoclave o bien arriba, en medio y abajo.
- 4.2 Aumentar el tiempo de esterilización cuando sea mucha la carga a esterilizar.
- 4.3 Llevar a cabo el ciclo de esterilización, al final de este abrir un poco la puerta del autoclave y dejar enfriar las ampolletas antes de sacarlas.
- 4.4 Incubar las ampolletas a 56°C por 48 horas hasta 5 días.

5.0 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

5.1 La presencia de turbidez (crecimiento) y un color amarillo indica un proceso de esterilización incompleta.



**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA EL MONITOREO DEL PROCESO DE ESTERILIZACIÓN  
POR CALOR HÚMEDO**

**NUMERO DE REVISIÓN** \_\_\_\_\_ **CÓDIGO**  
**PNO-CM-00-16**

**FECHA DE REVISIÓN:** \_\_\_\_\_ **HOJA 2 DE 2**

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
<b>FIRMA</b>			
<b>NOMBRE</b>	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
<b>FECHA</b>			

- 5.2 Un color púrpura y sin turbidez indica que el proceso de esterilización fue completo.
- 5.3 Los esterilizadores demasiado empacados dan como resultado un color café a rojo indicando una esterilización completa.
- 6.0 ELIMINACION DE LOS INDICADORES BIOLÓGICOS
- 6.1 Esterilizar a vapor a 121°C por un período no menor de 30 min.
- 7.0 ANEXOS
- 7.10 Anexo I : Registro del monitoreo de esterilización por calor húmedo.



**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA EL MONITOREO DEL PROCESO DE ESTERILIZACIÓN  
POR CALOR SECO**

<b>NUMERO DE REVISIÓN</b> _____	<b>CÓDIGO PNO-CM-00-17</b>
<b>FECHA DE REVISIÓN:</b> _____	<b>HOJA 1 DE 2</b>

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
<b>FIRMA</b>			
<b>NOMBRE</b>			
<b>FECHA</b>			

1.0 OBJETIVO

- 1.1 Determinar la eficiencia del proceso de esterilización por calor seco, realizando un monitoreo de cada uno de los procesos mediante el uso de indicadores biológicos.

2.0 INTRODUCCIÓN

- 2.1 Para certificar el ciclo de esterilización por calor seco es necesario realizar un monitoreo de cada uno de los procesos mediante el uso de indicadores biológicos, los cuales deberán ser colocados en aquellas zonas que se hayan detectado como zonas críticas.

3.0 MATERIAL Y EQUIPO

- 3.1 Tijeras estériles.  
3.2 Pinzas estériles.  
3.3 Tubos con 10 ml de caldo soya tripticaseína.  
3.4 Estufa a 35°C.  
3.5 Homo Pasteur

4.0 TÉCNICA

- 4.1 Colocar los Indicadores Biológicos Microtec CS/OE, en cada nivel del homo cada vez que se lleva a cabo un ciclo de esterilización.
- 4.2 Al termino de del ciclo sacar los indicadores biológicos y proteger de cualquier tipo de contaminación.
- 4.3 En una área estéril, cortar con las tijeras estériles cortar y abrir una de las esquinas del sobre de papel.
- 4.4 Con la ayuda de unas pinzas estériles sacar el indicador biológico Microtec CS/OE expuesto y transferirlo asépticamente a un tubo que contenga 10 ml de caldo soya tripticaseína.
- 4.5 Incubar durante 7 días a 35°C, realizando observaciones diariamente.
- 4.6 Simultáneamente inocular como testigo positivo un indicador biológico que no haya sido sometido al ciclo de esterilización.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA EL MONITOREO DEL PROCESO DE ESTERILIZACIÓN  
POR CALOR SECO**

<b>NUMERO DE REVISIÓN</b> _____	<b>CÓDIGO</b> <b>PNO-CM-00-17</b>
<b>FECHA DE REVISIÓN:</b> _____	<b>HOJA 2      2</b>

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
<b>FIRMA</b>			
<b>NOMBRE</b>			
<b>FECHA</b>			

**5.0 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

- 5.1 Los tubos con los indicadores sometidos al ciclo de esterilización, no deberán presentar crecimiento.
- 5.2 El tubo con el testigo positivo deberá de presentar crecimiento al termino del periodo de incubación, mostrando una película o sedimento con un pigmento característico de color café-naranja brillante.

**6.0 ELIMINACIÓN DE RESIDUOS**

- 6.1 Después del periodo de incubación y efectuadas las observaciones pertinentes, desechar los indicadores biológicos Microtec CS/OE, esterilizar por vapor a 121°C por un periodo no menor de 30 min.

**7.0 REGISTROS**

- 7.1 Bitácora del monitoreo de esterilización por calor seco.

**8.0 ANEXOS**

- 8.1 Formato I: Bitácora del monitoreo de esterilización por calor seco.



**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA PREPARACION DEL AREA DE TRABAJO**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-18

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 1 DE 1

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

1.0 OBJETIVO

1.1 Establecer las condiciones de trabajo, para evitar el riesgo de contaminación de las muestras, asiendo uso de sanitizantes-desinfectantes, indicados por el programa de rol de sanitizantes.

2.0 INTRODUCCIÓN

2.1 Una forma de garantizar resultados confiables es creando y manteniendo el área de trabajo aséptica. Un laboratorio de microbiología debe mantenerse limpio a nuestros ojos y además debe ser libre de entidades físicas, químicas, biológicas indeseables o procedentes de otros procesos de fabricación que pueden ser viables y/o no viables.

3.0 MATERIAL Y REACTIVOS

- 3.1 Alcohol al 70%
- 3.2 Desinfectante H1001
- 3.3 Desinfectante Hil phene
- 3.4 Desinfectante SANI-Q
- 3.5 Desinfectante Supergard

4.0 TÉCNICA

- 4.1 Cerrar la puerta del laboratorio para evitar corrientes de aire, mantenerla así durante el tiempo que dure el trabajo.
- 4.2 Sanitizar el área de siembra con el desinfectante correspondiente según el programa de rol de desinfectantes (Anexo I), aplicar con un atomizador, dejar actuar el tiempo indicado para su acción.
- 4.3 Disponer la Campana de Flujo Laminar para su uso según el procedimiento de uso. Ver PNO-CM-00-24
- 4.4 Sanitizar y desinfectar todo el material que baya a ser requerido para los análisis antes de ser introducidos al área de siembra y/o a la campana de flujo laminar.

5.0 ANEXOS

- 5.1 Anexo I: Rol de Desinfectantes

**ANEXO I  
ROL DE DESINFECTANTES**

**PROGRAMA DE ROTACIÓN DE SANITIZANTES**

<b>MES</b>	<b>SUPERGARD</b>	<b>H-101</b>	<b>HIL PHENE II</b>	<b>SANIQ</b>
ENERO	16-31			1-15
FEBRERO		1-15	16-28	
MARZO	16-31			1-15
ABRIL		1-15	16-30	
MAYO	16-31			1-15
JUNIO		1-15	16-30	
JULIO	16-31			1-15
AGOSTO		1-15	16-31	
SEPTIEMBRE	16-30			1-15
OCTUBRE		1-15	16-31	
NOVIEMBRE	16-30			1-15
DICIEMBRE		1-15	16-31	

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA EXTRAER AL PRODUCTO DE SU CONTENEDOR**

NUMERO DE REVISIÓN    \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
**PNO-CM-00-19**

FECHA DE REVISIÓN:    \_\_\_\_\_

HOJA 1 DE 3

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

**1.0    OBJETIVO**

1.1    Describir la forma adecuada de extraer la muestra de su contenedor, para su análisis microbiológico.

**2.0    INTRODUCCIÓN**

2.1    Los cosméticos tiene diferentes presentaciones y contenedores dependiendo de la naturaleza de estos, en algunas ocasiones resulta difícil poder extraer la muestra por lo que se requiere la utilización de herramientas.

**3.0    MATERIAL Y REACTIVOS**

- 3.1    Espátulas sanitizadas
- 3.2    Cuchillos sanitizados
- 3.3    Toallas de papel sanitizadas
- 3.4    Alcohol al 70%

**4.0    TÉCNICA**

**4.1    Lápiz de madera**

- 4.1.1    Limpiar la superficie del lápiz con una toalla de papel impregnada de alcohol al 70%.
- 4.1.2    Apoyarse en la superficie de la campana de flujo laminar y encajar la punta del cuchillo sanitizado por la mitad del lápiz.
- 4.1.3    Tratar de girar el cuchillo sin dejar de hacer presión sobre el lápiz para que se abra horizontalmente.
- 4.1.4    Separar las dos partes del lápiz con la mano.
- 4.1.5    Con la punta del cuchillo sacar la puntilla.

**4.2    Lápiz Retráctil**

- 4.2.1    Limpiar la superficie del lápiz con una toalla de papel impregnada de alcohol al 70%.
- 4.2.2    Quitar el guardapuntas tratando de no lastimar la punta.
- 4.2.3    Sujetar verticalmente el lápiz.



**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA EXTRAER AL PRODUCTO DE SU CONTENEDOR**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-19

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 2 DE 3

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

- 4.2.4 Con una mano sujetar el barril y con la otra mano la punta.
- 4.2.5 Retirar la punta presionando con el dedo pulgar hacia arriba, de tal forma que se desamble y deje al descubierto la puntilla.

**4.3 Lápiz B Matic**

- 4.3.1 Limpiar la superficie del lápiz con una toalla de papel impregnada de alcohol al 70%.
- 4.3.2 Quitar el guardapuntas tratando de no lastimar la punta.
- 4.3.4 Sujetar verticalmente el lápiz.
- 4.3.5 Con una mano sujetar el barril y con la otra mano la punta.
- 4.3.6 Retirar la punta presionando con el dedo pulgar hacia arriba, de tal forma que se desamble.
- 4.3.7 Meter el tornillo dentro de la punta, la puntilla saldrá por el orificio.

**4.4 Sombras, Rubores y Polvos Compactos**

- 4.4.1 Tomar la charola de alguno de sus extremos.
- 4.4.2 Con una espátula sanitizada raspar el polvo.

**4.5 Mascaras**

- 4.5.1 Limpiar la superficie del contenedor con una toalla de papel impregnada de alcohol al 70%.
- 4.5.2 Apoyándose en la superficie de la campana de flujo laminar, cortar con un cuchillo sanitizado el soporte del contenedor
- 4.5.3 Tomar el producto con una espátula sanitizada.

**4.6 Tinteros**

- 4.6.1 Limpiar la superficie del contenedor con una toalla de papel impregnada de alcohol al 70%.
- 4.6.2 Retirar la tapa del tintero.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION  
PARA EXTRAER AL PRODUCTO DE SU CONTENEDOR**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-19

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 3 DE 3

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

4.6.3 Con la punta de un cuchillo sanitizado, quitar el dosificador de la botella del tintero.

**4.7 Gloss**

4.7.1 Limpiar la superficie del contenedor con una servil olla impregnada de alcohol al 70%.

4.7.2 Retirar la tapa del envase del gloss.

4.7.3 Con una espátula sanitizada tomar la muestra.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA INACTIVACIÓN DE CONSERVADORES  
PRESENTES EN LAS MUESTRAS**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-20

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 1 DE 2

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

1.0 OBJETIVO

1.1 Describir como preparar las muestras para su análisis microbiológico eliminando la acción de los conservadores, utilizando una solución neutralizante y permitir así el crecimiento microbiano.

2.0 INTRODUCCIÓN

2.1 El método de análisis microbiológico debe permitir el crecimiento de cualquier microorganismo bacteriano o fungino presente en la muestra, esto se logra inactivando los inhibidores de crecimiento microbiano, al adicionar soluciones neutralizantes que contengan cloruro de sodio, lecitina, tween 80.

3.0 MATERIALES Y EQUIPO

- 3.1 Tubos estériles con 18 y 54 ml de solución neutralizante (R2)
- 3.2 Bolsas estériles de 100 ml
- 3.3 Balanza semianalítica
- 3.4 Espátulas sanitizadas
- 3.5 Baño maría a 45°C

4.0 TÉCNICA

4.1 **Gránulos y Producto terminado**

- 4.1.1 Pesar 2 gramos de la muestra en una bolsa estéril debidamente identificada.
- 4.1.2 Adicionar 18 ml de solución neutralizante R2. Dilución 1:10
- 4.1.3 Homogenizar la muestra agitando o presionando manualmente para su incorporación con la solución.
- 4.1.4 En caso de ser necesario poner la bolsa en baño maría por 15 minutos a 45°C para homogenizar la muestra.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA INACTIVACIÓN DE CONSERVADORES  
PRESENTES EN LAS MUESTRAS**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

PNO-CM-00-20

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 2 DE 2

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

**4.2 Materias primas**

- 4.2.1 Pesar 6 gramos de la muestra en una bolsa estéril debidamente identificada.
- 4.2.2 Adicionar 54 ml de solución R2. Dilución 1:10
- 4.2.3 Homogenizar la muestra agitando o presionando manualmente para su incorporación con la solución.
- 4.2.4 En caso de ser necesario poner la bolsa en baño maría por 15 minutos a 45°C para homogenizar la muestra.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA PREPARACION DE SOLUCIONES Y REACTIVOS**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-21

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 1 DE 3

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

1.0 OBJETIVO

Describir los pasos a seguir para preparar las soluciones que serán utilizadas durante el análisis microbiológico de las muestras.

2.0 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

2.1 **Solución Stock Neutralizante (R-1)**

Lecitina	40 g
Tween	280 ml
(R-3) Solución Stock Buffer Fosfatos	1.25 ml

2.1.1 Calentar la lecitina en un vaso de precipitado cuidando de no rebasar los 45°C.

2.1.2 En otro vaso con una capacidad mayor calentar los 280 ml de tween a 45°C, agregar con agitación constante la lecitina, mantener la temperatura.

2.1.3 Diluir con agua destilada y caliente a 80°C hasta 1 litro.

2.1.4 Agregar la solución Stock Buffer Fosfatos y agitar hasta una perfecta incorporación

2.1.5 Ajustar el pH a 7.2. Esterilizar en autoclave a 121°C por 20 minutos.

2.2 **Buffer de Solución Salina Neutralizante (R-2)**

Cloruro de Sodio	16.2g
(R-1) Solución Stock Neutralizante	100 mL
(R-3) Solución Stock Buffer Fosfatos	25 mL
Agua desionizada	1675 mL

2.2.1 Pesar y medir los volúmenes indicados

2.2.2 Mezclar perfectamente y distribuir en tubos las cantidades exactas a utilizar.

2.2.3 Esterilizar en autoclave a 121°C por 20 minutos.

2.3 **Solución Stock Buffer Fosfatos (R-3)**

Fosfato de Potasio monobásico	34g
Agua desionizada	500 mL

2.3.1 En 500 ml de Agua desionizada disolver los 34g de Fosfato de potasio monobásico

2.3.2 Ajustar el pH a 7.2 con una solución de Hidróxido de Sodio 1.0N.

2.3.3 Diluir hasta 1 litro..

2.3.4 Mezclar y esterilizar en autoclave a 121°C por 20 minutos.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA PREPARACION DE SOLUCIONES Y REACTIVOS**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
**PNO-CM-00-21**

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 2 DE 3

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

**2.4 Solución de Hidróxido de Sodio 1.0N**

Hidróxido de sodio                    40 g  
 Agua descarboxilada c.b.p.        1000 MI

2.4.1 Disolver en 500 mL de Agua descarboxilada el hidróxido de sodio

2.5.1 Una vez disuelto aforar a 1 L con agua descarboxilada

**2.5 Solución de etanol 80% y HCl al 1% v/v**

Etanol                                        80 mL  
 HCl concentrado                        1.0 mL  
 Agua desionizada c.b.p.            100 mL

2.5.1 Mezclar el etanol con el HCL

2.6.2 Aforar a 100 mL con el agua desionizada

**2.6 Solución de agua oxigenada al 3% v/v**

Peroxido de hidrogeno                3 mL  
 Agua desionizada c.b.p.            100 mL

2.6.1 Mezclar w/ peroxido en un poco de agua desionizada

2.6.2 Aforar a 100ml con el agua desionizada

**2.7 Solución de Cristal Violeta**

Cristal Violeta                            0.010 g  
 Ácido acético glacial                10 mL

2.7.1 Disolver el cristal violeta en el ácido acético

2.7.2 Envasar protegiéndolo de la luz

**2.8 Solución Yodo-Yodurada**

Yoduro de potasio                        2.0 g  
 Yodo                                         1.0 g  
 Agua desionizada c.b.p.            100 mL

2.8.1 Triturar en un mortero el yodo y el yoduro de potasio

2.8.2 Disolver el yodo y el yoduro de potasio con un poco de agua

2.8.3 Una vez disueltos llevar a un volumen de 100 mL

Envasar y protegerlo de la luz.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA PREPARACION DE SOLUCIONES Y REACTIVOS**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-21

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 3 DE 3

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

**2.9 Solución Safranina**

Safranina "O"                      2.5 g  
Alcohol etílico al 95%            100 ml

2.9.1 Disolver la safranina "O" en el alcohol etílico

2.9.2 Tomar 10 mL de esta solución y llevarla a 100 mL con agua

**2.10 Solución Alcohol-Acetona**

Alcohol al 95%                    50 ml  
Acetona                              50 ml

2.10.1 Mezclar y agitar.

**2.11 Solución de Cloruro de Benzalconio al 5%**

Solución de Cloruro de Benzalconio al 10%    500 mL  
Agua desmineralizada                              500 mL

2.11.1 Mezclar y agitar.

**2.12 Solución Citricidal 500ppm.**

Citricidal liquido                0.50 mL  
Agua desmineralizada c.b.p 1000mL

2.12.1 Mezclar y agitar.

**2.13 Solución AgNO<sub>3</sub> al 1%**

AgNO<sub>3</sub>                                1 gr  
Agua desmineralizada c.b.p. 100mL

2.13.1 Mezclar y agitar.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA EL MANEJO Y USO DEL MICROSCOPIO  
MICRO STAR ONE TEN**

NUMERO DE REVISIÓN _____	CÓDIGO PNO-CM-00-22
FECHA DE REVISIÓN: _____	HOJA 1 DE 3

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

1.0 OBJETIVO

1.1 Describir las acciones para el uso y mantenimiento del microscopio, para asegurar su correcto funcionamiento.

2.0 INTRODUCCIÓN

2.1 El microscopio óptico se compone de una parte mecánica, que sirve de soporte y de una parte óptica constituida por tres sistemas de lentes: el condensador, el objetivo y el ocular. Ya que estos tres sistemas funcionan en forma conjunta, necesariamente tienen que ser coherentes y así no es recomendable, por ejemplo, el empleo de un objetivo de alta calidad en combinación con un condensador de calidad inferior.

3.0 DESCRIPCIÓN TÉCNICA

3.1 **Marca Comercial:** MICRO STAR ONE TEN

3.2 **Proveedor:** AMERICAN OPTICAL

3.3 **N° de Inventario:** ACALMIEOMMICA

3.4 **Fecha de Entrada:** 1987

4.0 MATERIAL Y EQUIPO

4.1 Papel Seda

4.2 Microscopio óptico marca

4.3 Aceite de Inmersión

5.0 TÉCNICA

5.1 **MANEJO Y USO (Ver Anexo I)**

5.1.1 Colocar el objetivo de menor aumento en posición de empleo

5.1.2 Bajar la platina completamente.

5.1.3 Colocar el laminilla sobre la platina y sujetarla con las pinzas metálicas.



**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA EL MANEJO Y USO DEL MICROSCOPIO  
MICRO STAR ONE TEN**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-22

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 2 DE 3

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

5.1.4 Comenzar la observación con el objetivo 40 X. Y realizar el enfoque como sigue:

- a) Mirando directamente y no a través del ocular acercar al máximo la lente del objetivo a la preparación, empleando el tornillo macrométrico.
- b) Mirando, a través de los oculares, separar lentamente el objetivo de la preparación con el macrométrico y , cuando se observe algo nítida la muestra, girar el micrométrico hasta obtener un enfoque fino.

5.1.5 Girar el revólver hacia el objetivo de inmersión 100X dejando a medio camino éste y el de 40X.

5.1.6 Colocar una gota mínima de aceite de inmersión sobre el círculo de luz.

5.1.7 Terminar de girar suavemente el revolver hasta la posición del objetivo de inmersión.

5.1.8 Mirando directamente al objetivo, subir la platina lentamente hasta que la lente toque la gota de aceite. En ese momento se nota como si la gota ascendiera y se adosara a la lente.

5.1.9 Enfocar cuidadosamente con el micrométrico.

5.1.10 Una vez finalizada la observación de la preparación bajar la platina y colocar el objetivo de menor aumento girando el revólver.

5.1.11 Retirar la laminilla de la platina.

**5.2 MANTENIMIENTO Y PRECAUCIONES**

5.2.1 Una vez que se haya puesto aceite de inmersión sobre la preparación, ya no se puede volver a usar el objetivo 40X sobre esa zona, pues se mancharía, de aceite. Por tanto, si se desea enfocar otro campo, bajar la platina y repetir la operación desde el paso 4.1.4.

5.2.2 Al finalizar el trabajo, dejar puesto el objetivo de menor aumento en posición de observación, asegurar que la parte mecánica de la platina no sobresale del borde de la misma y dejarlo cubierto con su funda.

5.2.3 Cuando no se está utilizando el microscopio, mantenerlo cubierto con su funda para evitar que se ensucie y dañen las lentes.

5.2.4 Nunca hay que tocar las lentes con las manos. Si se ensucian , limpiar muy suavemente con un papel seda.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA EL MANEJO Y USO DEL MICROSCOPIO  
MICRO STAR ONE TEN**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-22

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

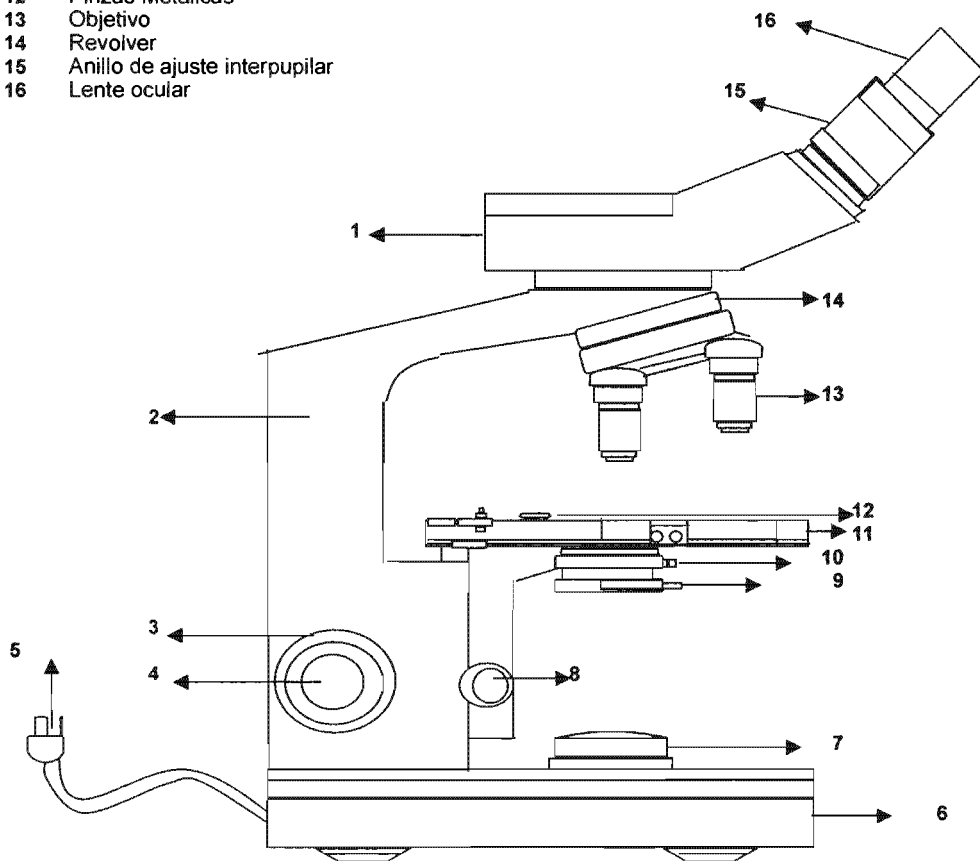
HOJA 3 DE 3

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

- 4.2.5 No dejar el portaobjetos puesto sobre la platina si no se está utilizando el microscopio.
- 4.2.6 Después de utilizar el objetivo de inmersión, limpiar el aceite que quede en el objetivo con pañuelos especiales para óptica o con papel filtro, pasándolo en un solo sentido y con suavidad.
- 4.2.7 Si el aceite ha llegado a secarse y pegarse en el objetivo, limpiar con una mezcla de alcohol-acetona (7:3) o xilol.
- 4.2.8 No forzar nunca los tornillos, giratorios del microscopio (macrométrico, micrométrico, platina, revólver y condensador).
- 4.2.9 El cambio de objetivo se hace girando el revólver y dirigiendo siempre la mirada a la preparación para prevenir el roce de la lente con la muestra.
- 4.2.10 Mantener seca y limpia la platina del microscopio. Si se derrama sobre ella algún líquido, secar con un paño. Si se mancha de aceite, limpiar con un paño humedecido en xilol.
- 5.0 ANEXOS
- 5.1 Anexo I: Esquema del microscopio

## ANEXO I DIAGRAMA DEL MICROSCOPIO

- 1 Cabeza Vincular
- 2 Brazo
- 3 Tornillo Macrometrico
- 4 Tornillo Micrométrico
- 5 Cable conductor de corriente
- 6 Base
- 7 Lámpara de Iluminación
- 8 Perilla de elevación del condensador
- 9 Diafragma de Iris
- 10 Tornillo sujetador del condensador
- 11 Platina
- 12 Pinzas Metálicas
- 13 Objetivo
- 14 Revolver
- 15 Anillo de ajuste interpupilar
- 16 Lente ocular



**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION  
PARA EL USO, MANEJO Y LIMPIEZA DEL HORNO  
MARCA ROCHA**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-23

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 1 DE 3

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

1.0 OBJETIVO

1.1 Describir las características técnicas del horno eléctrico, el método operativo de trabajo con las debidas precauciones que hay que tener en su utilización; así como el método de limpieza apropiado.

2.0 INTRODUCCIÓN

2.1 Para la esterilización por calor seco es necesaria una temperatura elevada, entre 170-180°C durante 1-2 horas. El aire caliente circula en una cabina hermética por conductancia. El calor seco se emplea en materiales resistentes al calor o aquellos que no permitan la penetración del vapor.

3.0 DESCRIPCIÓN TÉCNICA

3.1 **Marca Comercial:** ROCHA  
**Proveedor:** RIOS ROCHA  
**N° de Inventario:** 2CALMIEQESSRB  
**Fecha de Entrada:** N/A

4.0 PARTES DEL EQUIPO

- 4.1 Porta-termómetro
- 4.2 Control de temperatura
- 4.3 Foco rojo de encendido
- 4.4 Cable conductor de corriente

Ver Anexo II: Diagrama del horno marca ROCHA

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA EL USO, MANEJO Y LIMPIEZA DEL HORNO  
MARCA ROCHA**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-23

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 2 DE 3

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

5.0 FUNCIONAMIENTO

- 5.1 Introducir en el horno el material a esterilizar.
- 5.2 Colocar un termómetro en el porta termómetro del horno para verificar el registro de la temperatura
- 5.3 Seleccionar la temperatura de acuerdo al material que desea esterilizar. En ese momento el foco rojo se encenderá.

MATERIAL	TEMPERATURA
Vidriería, instrumentos, jeringas, tapones, hisopos de algodón, aplicadores de madera	160°C
Vidriería, instrumentos no cortantes	180°C
Vidriería, instrumentos cortantes	150°C
Aceites, glicerina, polvos secantes	150°C

- 5.4 Cuando se alcanza la temperatura seleccionada el foco rojo del horno se apaga. Comenzar a tomar el tiempo de acuerdo a la siguiente tabla

MATERIAL	TIEMPO
Vidriería, instrumentos, jeringas, tapones, hisopos de algodón, aplicadores de madera	1 hora
Vidriería, instrumentos no cortantes	2 horas
Vidriería, instrumentos cortantes	30 min.
Aceites, glicerina, polvos secantes	2 horas
	1 hora

- 5.5 Al término del tiempo se apagar el horno con el botón de control de temperatura
- 5.6 Esperar a que descienda la temperatura
- 5.7 Sacar el material esterilizado del horno y anotar en el "Registro de uso del horno" Anexo I.

6.0 LIMPIEZA

- 6.1 El exterior del horno se debe limpiar diariamente con una franela húmeda.
- 6.2 El interior del horno limpiar cada quince días con una solución de detergente.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA EL USO, MANEJO Y LIMPIEZA DEL HORNO  
MARCA ROCHA**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-23

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 3 DE 3

	ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

7.0 CALIBRACIÓN Y/O VALIDACIÓN

- 7.1 La calibración interna se llevar a cabo cada quince días, utilizar termómetros calibrados
- 7.2 Realizar una vez a la semana la validación de esterilización, siguiendo el Método Monitoreo de la Esterilización por Calor Seco. PNO-CM-00-17

8.0 PRECAUCIONES

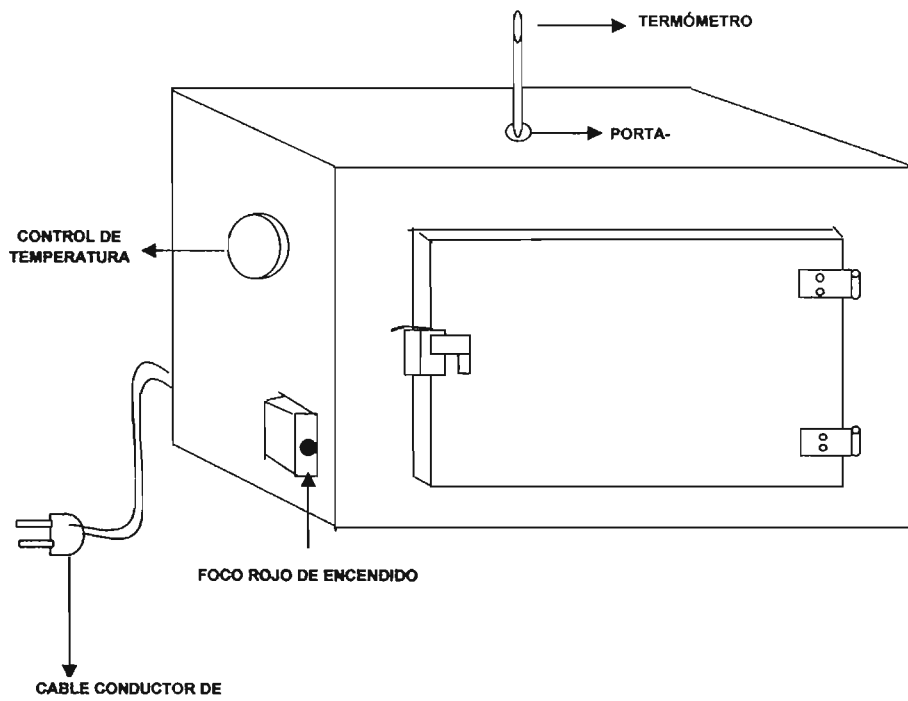
- 8.1 Abrir con cuidado la puerta si el Horno está todavía caliente.
- 8.2 Dejar que el material se enfríe o utilizar guantes resistentes al calor para extraer los artículos del horno.
- 8.3 El plástico (por ejemplo las tapas de los envases) no suele resistir la temperatura empleada en los procesos de esterilización por calor seco evitar introducir este material.

9.0 ANEXOS

- 9.1 Anexo I: Registro del uso del horno marca ROCHA
- 9.2 Anexo II: Diagrama del horno marca ROCHA



**ANEXO II: DIAGRAMA DEL HORNO ELÉCTRICO  
MARCA ROCHA**





**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA EL USO, MANEJO Y LIMPIEZA DE LA CAMPANA  
DE FLUJO LAMINAR MARCA VECO**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-24

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 1 DE 3

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

1.0 OBJETIVO

- 1.1 Describir las características técnicas de la campana de flujo laminar, el método operativo de trabajo con las debidas precauciones en su utilización; así como el método de limpieza apropiado.

2.0 INTRODUCCIÓN

- 2.1 Las unidades de flujo laminar se han diseñado para crear un área de trabajo en la cual se protejan todos los materiales susceptibles de ser contaminados por el aire ambiente. Así mismo las unidades previenen la contaminación cruzada al evitar que las partículas originadas en el área de trabajo se muevan en forma turbulenta durante el proceso. La unidad de flujo laminar es un dispositivo que ayuda a mantener un área limpia o estéril. Para lograr este último fin, es necesario que todas las superficies de la parte inferior de la unidad, es decir, de la mesa, acrílicos laterales y la parte superior, sean previamente desinfectados con algún agente germicida. Los filtros HEPA evitan la entrada de la contaminación pero si las partículas contaminantes que se han generado en el interior de la zona o que se encuentran en ella son de una dimensión tal que no puedan ser removidas por la corriente de aire, permanecerán en el interior del área de trabajo. Por lo tanto es indispensable que se efectúe una limpieza con germicidas antes de proceder a trabajar en forma estéril dentro de las unidades.

3.0 DESCRIPCIÓN TÉCNICA

- 3.1 **Marca Comercial:** VECO  
 3.2 **Proveedor:** VECO. Calle 13 e. No. 116 Civac Morelos  
 3.3 **N° de Inventario:** 2CALMIEQCFLA  
 3.4 **Fecha de Entrada:**

4.0 PARTES DEL EQUIPO

- 4.1 Toma de aire  
 4.2 Motoventilador  
 4.3 Filtro absoluto  
 4.4 Rejilla protectora  
 4.5 Panel de control  
 4.5.1 Botón de encendido  
 4.5.2 Toma de corriente  
 4.5.3 Botón de la lámpara de luz blanca

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA EL USO, MAJENO Y LIMPIEZA DE LA CAMPANA  
DE FLUJO LAMINAR MARCA VECO**

<b>NUMERO DE REVISIÓN</b> _____	<b>CÓDIGO</b> <b>PNO-CM-00-24</b>
<b>FECHA DE REVISIÓN:</b> _____	<b>HOJA 2 DE 3</b>

	<b>ELABORO</b>	<b>REVISO</b>	<b>APROBÓ</b>
<b>FIRMA</b>			
<b>NOMBRE</b>			
<b>FECHA</b>			

**5.0 FUNCIONAMIENTO**

- 5.1 Encender la campana de flujo laminar aproximadamente 15 minutos antes de iniciar la siembra.
- 5.2 Sanitizar la campana de flujo laminar con una solución de Cloruro de Benzalconio al 5% o Alcohol al 70%
- 5.3 Introducir a la mesa de trabajo de la campana de flujo laminar material y equipo sanitizado.
- 5.4 Comenzar trabajar procurando no tapar los filtros HEPA
- 5.5 Al terminar de trabajar sanitizar nuevamente la campana.

**6.0 LIMPIEZA**

- 6.1 Limpiar adecuadamente la campana con esponja, agua y jabón todos los días antes de comenzar las actividades.

**7.0 CALIBRACIÓN Y/O VALIDACIÓN**

**7.1 VALIDACIÓN INTERNA**

- 7.1.1 Encendida, sanitizada y sin ningún tipo de material dentro de la campana de flujo laminar realizar la validación.
- 7.1.2 Una vez por semana exponer una placa de agar soya tripticaseína (ATS) y una placa de agar dextrosa Sabouraud (ADS) durante 30 minutos.
- 7.1.3 Incubar la placa de agar soya tripticaseína a 37°C durante 24 horas.
- 7.1.4 Incubar la placa de agar dextrosa Sabouraud a 25°C durante 24 a 48 horas.
- 7.1.5 No debe observarse crecimiento microbiano alguno.
- 7.1.6 Si se observa crecimiento microbiano sanitizar la campana de flujo laminar y el filtro HEPA debe ser cambiado

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA EL USO, MANEJO Y LIMPIEZA DE LA CAMPANA  
DE FLUJO LAMINAR MARCA VECO**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-24

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 3 DE 3

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

**7.2 VALIDACIÓN EXTERNA**

- 7.2.1 Semestralmente realizar la validación de los filtros por un laboratorio externo autorizado.
- 7.2.2 El laboratorio entregará un reporte final del resultado

**8.0 MANTENIMIENTO**

- 8.1 El laboratorio externo que realice la validación, cambiara los filtros cuando se necesario.

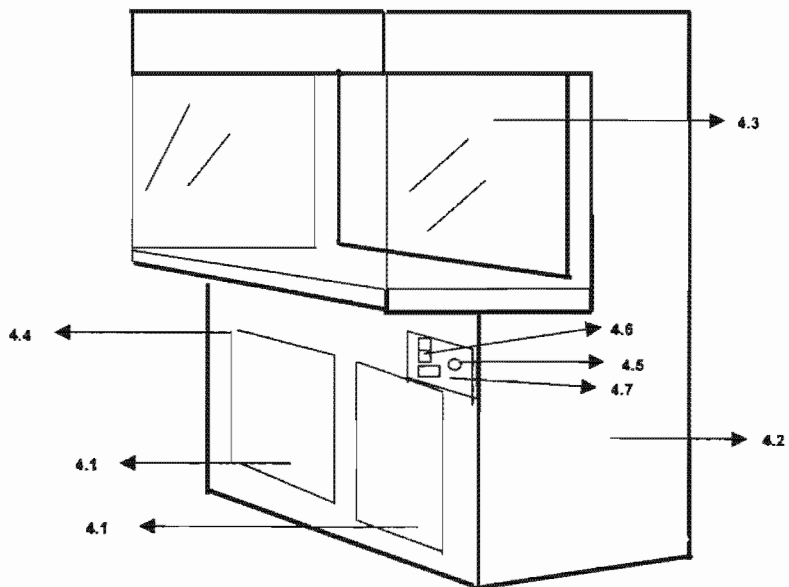
**9.0 PRECAUCIONES**

- 9.1 No tapar los filtros cuando se este trabajando en la campana de flujo laminar  
Trabaje siempre dentro de la campana de flujo laminar para realizar la siembra en condiciones de esterilidad
- 9.2 Cuando no este en uso no colocar ningún objeto dentro de la campana .

**1.0 ANEXOS**

- 1.1 Anexo 1: Diagrama Esquemático de la Campana de Flujo Laminar.

**ANEXO 1**  
**DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE LA CAMPANA DE FLUJO LAMINAR VECO**



- 4.1 Toma de aire
- 4.2 Motoventilador
- 4.3 Filtro absoluto
- 4.4 Rejilla protectora
- 4.5 Panel de control
- 4.5.1 Botón de encendido
- 4.5.2 Toma de corriente
- 4.5.3 Botón de la lámpara de luz blanca

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA EL USO, MANEJO Y LIMPIEZA DE LA ESTUFA  
MARCA RIOSSA**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-25

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 1 DE 2

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

1.0 OBJETIVO

Describir las características técnicas de la estufa de cultivo, el método operativo de trabajo con las debidas precauciones para su utilización; así como el método de limpieza apropiado.

2.0 INTRODUCCIÓN

Las estufas de cultivo son cabinas que incorporan un sistema de calentamiento y/o enfriamiento, con el fin de mantener una determinada temperatura en su interior, ajustándolos a los límites de tolerancia.

3.0 DESCRIPCIÓN TÉCNICA

3.1 **Marca Comercial:** RIOSSA

3.2 **Proveedor:** RIOS ROCHA

3.3 **N° de Inventario:** 2CALMIEQHORB

3.4 **Fecha de Entrada:** N/A

4.0 PARTES DEL EQUIPO

4.1 Porta-termómetro

4.2 Control de temperatura

4.3 Foco rojo de encendido

4.4 Cable conductor de corriente

Ver Anexo II: Diagrama de la estufa marca RIOSSA

5.0 FUNCIONAMIENTO

5.1 Seleccionar con el botón de control de temperatura, a la se desee incubar.

5.2 Colocar el termómetro en el interior de la estufa para verificar la temperatura real. No retirar el termómetro, siempre debe mantener dentro.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA DEL USO, MANEJO Y LIMPIEZA DE LA ESTUFA  
MARCA RIOSSA**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-25

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 2 DE 2

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

5.3 Introducir el material a incubar perfectamente bien identificado.

5.4 Retirar el material después del tiempo de incubación.

6.0 LIMPIEZA

6.1 Desenchufar la estufa para su limpieza que se debe realizara una vez al mes.

6.2 No debe existir ningún material en incubación para realizar la limpieza.

6.3 Con la ayuda de una esponja y jabón, lavar la parte interna y externa de la incubadora.

6.4 Secar perfectamente.

6.5 Sanitizar la estufa con una solución de Alcohol al 70%

7.0 CONTROLES

7.1 Registrar la temperatura diariamente, en el grafico de control de temperatura formato registro diario de temperatura (Anexo I).

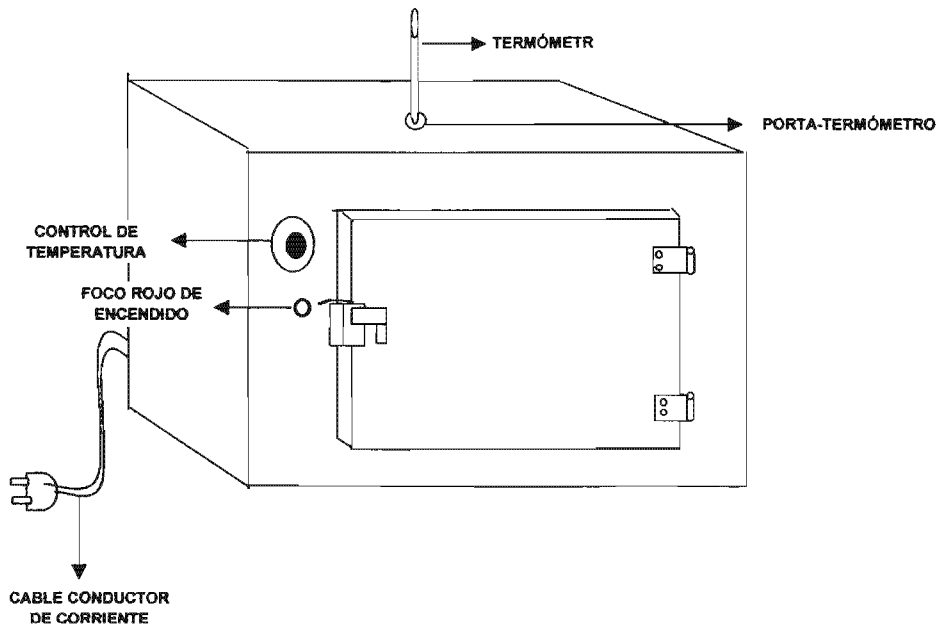
Si existe una variación en la temperatura se deberá de controlar por medio del botón selector de temperatura , ya sea aumentando o disminuyendo según se requiera.

8.0 ANEXOS

8.1 Anexo I: Formato del registro de temperatura de la estufa d marca RIOSSA.



**ANEXO II: DIAGRAMA DEL HORNO ELECTRICO  
MARCA RIOSSA**





**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA EL USO, MANEJO Y LIMPIEZA DEL AUTOCLAVE  
MARCA METRON**

NUMERO DE REVISIÓN _____	CÓDIGO PNO-CM-00-26
FECHA DE REVISIÓN: _____	HOJA 1 DE 2

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

1.0 OBJETIVO

1.1 Describir las características técnicas del Autoclave, el método operativo de trabajo con las debidas precauciones para su utilización; así como el método de limpieza apropiado.

2.0 INTRODUCCIÓN

2.1 Para la esterilización con vapor se requiere un autoclave. Los autoclaves son cámaras que se funcionan con vapor de agua controlado mediante una válvula para obtener una presión específica, hasta alcanzar una temperatura determinada, estas condiciones se mantienen durante el período de tiempo requerido.

3.0 DESCRIPCIÓN TÉCNICA

- 3.1 **Marca Comercial:** METRON
- 3.2 **Proveedor:** GRUPO INFRA
- 3.3 **N° de Inventario:** 2CALMIEQQAUTA
- 3.4 **Fecha de Entrada:** 1987

4.0 PARTES DEL EQUIPO

4.1 Las partes del equipo se describen en el Anexo I

5.0 FUNCIONAMIENTO

- 5.1 Colocar aproximadamente dos litros de agua desmineralizada en el interior del autoclave hasta llegar a la marca indicada en indicador del nivel de agua.
- 5.2 Coloque el material por esterilizar dentro del autoclave.
- 5.3 Coloque la tapa del autoclave, cerrar apretando fuertemente los tornillos superiores.
- 5.4 Asegúrese de que la tapa este nivelada para que cierre herméticamente.
- 5.5 Encender el autoclave, a una temperatura media ( al indicador de temperatura deberá estar en 4)

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA EL USO, MANEJO Y LIMPIEZA DEL AUTOCLAVE  
MARCA METRON**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
**PNO-CM-00-26**

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 2 DE 2

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

- 5.6 Para purgar el autoclave abrir la válvula, cuando se alcance una temperatura de 100°C se cerrar.
- 5.7 Cuando el barómetro indique una presión de 15 libras y el termómetro marque 121°C comenzar a tomar el tiempo de esterilización.
- 5.8 Transcurridos el tiempo de esterilización deseados, apagare el equipo.
- 5.9 Esperar a que el barómetro marque cero libras de presión interna, para abrir la válvula de seguridad, aflojar los tornillos superiores y levantar lentamente la tapa, para evitar una quemadura con el vapor.
- 5.1 Esperar a que el material se enfríe y colocarlo en su lugar, ya sea para utilizarlo, desecharlo o lavarlo.

**VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE LA OPERACIÓN**

- 6.1 Para asegurarse que la esterilización se lleve a cabo colocar al material la cinta testigo de esterilización, la cual tiene un indicador de color, el que cambia a color negro cuando se realiza la operación.
- 6.2 Llevar a cabo la validación utilizando Indicadores Biológicos. Método de monitoreo de esterilización por calor húmedo. PNO-CM-00-16

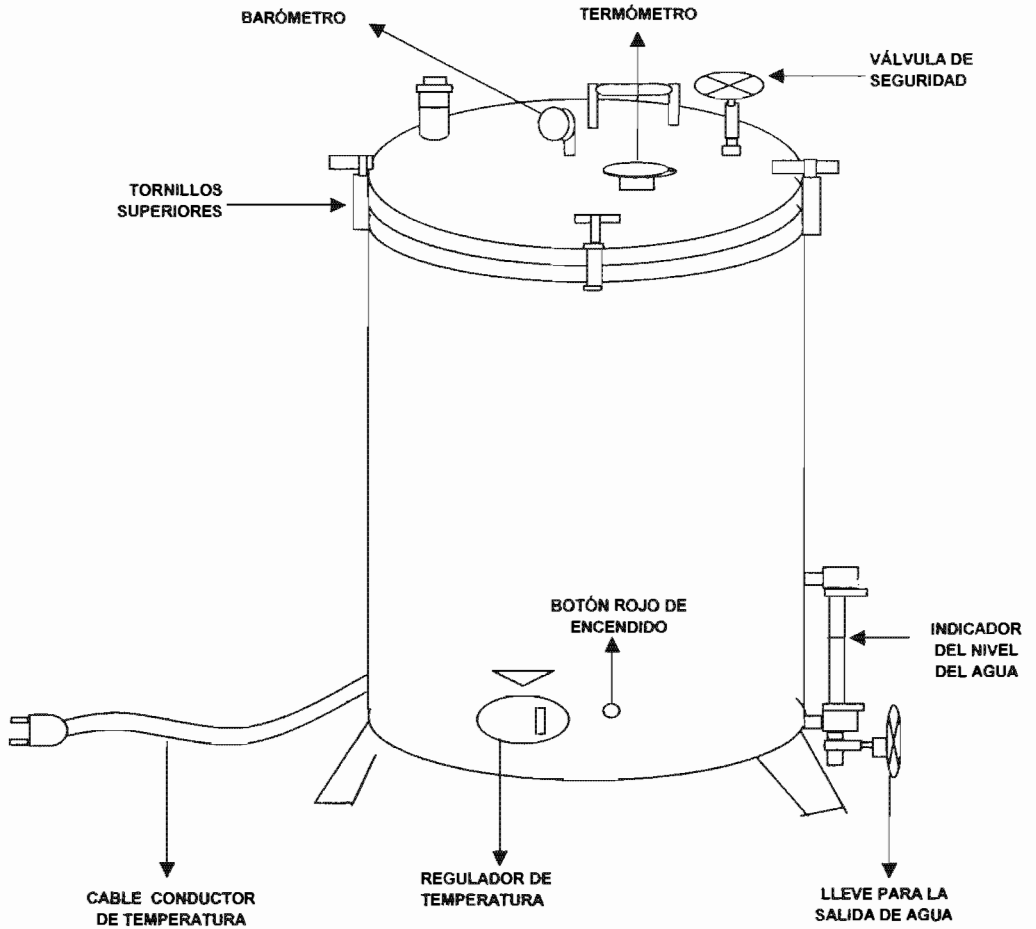
**PRECAUCIONES**

- 7.1 Se debe extraer todo el aire de la cámara de esterilización y de la carga dejando llegar a 100°C con la válvula de seguridad abierta.
- 7.2 Cargar el autoclave con frascos que tengan el mismo volumen.
- 7.3 Terminado el proceso, antes de abrir el autoclave reducir la presión y permitir que el vapor de agua se enfríe.
- 7.4 Se debe dejar enfriar la carga y utilizar guantes y lentes resistentes al calor para extraerla del autoclave.

**ANEXOS**

- 8.1 Anexo I: Diagrama del autoclave marca METRON

**ANEXO I  
DIAGRAMA DEL AUTOCLAVE MARCA METRON**



**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA EL USO, MANEJO Y LIMPIEZA DEL POTENCIOMETRO  
pH METER 220**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-27

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 1 DE 3

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

1.0 OBJETIVO

Describir las características técnicas del Potenciómetro, el método operativo de trabajo con las debidas precauciones para su utilización; así como el método de limpieza apropiado.

2.0 INTRODUCCIÓN

El Potenciómetro tiene incorporado un sistema de compensación de la temperatura y dos sistemas de regulación que permiten el ajuste independiente de las dos medidas.

La determinación del pH es un parámetro fundamental en el control de la calidad de la preparación de los medios de cultivo, ya que el pH tiene una gran influencia sobre el comportamiento de los medios de cultivo. Las medidas del pH se pueden efectuar en reactivos y en medios de cultivos líquidos y sólidos.

3.0 DESCRIPCIÓN TÉCNICA

- 3.1 **Marca Comercial:** pH METER 220
- 3.2 **Proveedor:** CORNING
- 3.3 **N° de Inventario:** 20CALMUEQPHMA
- 3.4 **Fecha de Entrada:** 1990

4.0 PARTES DEL EQUIPO

- 4.1 Botón de encendido
- 4.2 Botón de selección
- 4.3 Pantalla
- 4.4 Control de calibración 1
- 4.5 Control de calibración 2
- 4.6 Control de Temperatura
- 4.7 Electrodo

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA EL USO, MANEJO Y LIMPIEZA DEL POTENCIÓMETRO  
pH METER 220**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-27

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 2 DE 3

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

5.0 FUNCIONAMIENTO

- 5.1 Después de haber realizado la calibración del potenciómetro
- 5.2 Medir la temperatura de la solución a la que se le requiera medir su pH.
- 5.3 Ajustar el control de temperatura a la temperatura de la sustancia.
- 5.4 Introducir el electrodo a la sustancia.
- 5.5 Esperar a que se estabilice por lo menos un minuto.
- 5.6 Tomar la lectura de pH de la pantalla.
- 5.7 Sacar el electrodo de la sustancia.
- 5.8 Enjuagar con agua destilada.

6.0 LIMPIEZA

- 6.1 Retirar el polvo de la superficie del potenciómetro con una franela húmeda no usar solventes.
- 6.2 El electrodo se limpia con agua destilada, se retira los residuos de las soluciones frotando suavemente con una toalla de papel.

7.0 CALIBRACIÓN

- 7.1 Colocar el control de temperatura a 25°C.
- 7.2 Girar la perilla Cal 2 a 100%
- 7.3 Enjuagar el electrodo con agua destilada.
- 7.4 Introducir el electrodo en la solución Buffer de referencia pH y encender el potenciómetro.
- 7.5 Esperar hasta que se estabilice el indicador.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA EL USO, MANEJO Y LIMPIEZA DEL POTENCIOMETRO  
pH METER 220**

<b>NUMERO DE REVISIÓN</b> _____	<b>CÓDIGO</b> <b>PNO-CM-00-27</b>
<b>FECHA DE REVISIÓN:</b> _____	<b>HOJA 3 DE 3</b>

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
<b>FIRMA</b>			
<b>NOMBRE</b>			
<b>FECHA</b>			

- 7.1.6 Girar la perilla de calibración CAL 1, hasta lograr ajustarlo a 7.00.
- 7.1.7 Sacar el electrodo de la solución Buffer pH 7 y apagar el potenciómetro.
- 7.1.8 Enjuagar el electrodo con agua destilada.
- 7.1.9 Introducir el electrodo a la solución Buffer pH 4 y encender el potenciómetro.
- 7.1.10 Esperar hasta que se establezca el indicador.
- 7.1.11 Girar la perilla de calibración CAL 2 hasta ajustarlo a 4.00.
- 7.1.12 Sacar el electrodo de la solución Buffer pH 7 y apagar el potenciómetro.
- 7.1.13 Enjuagar el electrodo con agua destilada.

**8.0 MANTENIMIENTO**

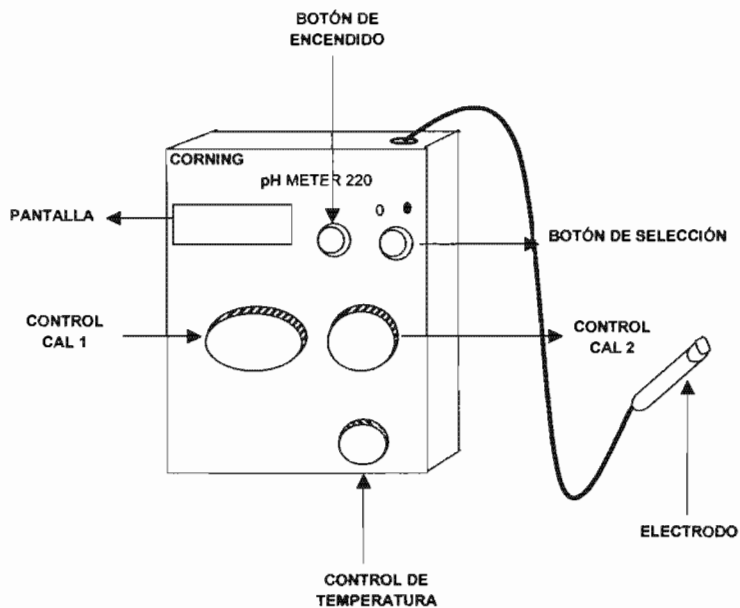
- 8.1 Una vez por semana
- 8.1.1 Limpiar el electrodo con una solución de Pepsina.
- 8.1.2 Eliminar la grasa enjugando al electrodo con acetona.

**9.0 PRECAUCIONES**

- 9.1 Hay que tener en cuenta que una inmersión prolongada del electrodo en acetona puede provocar la desecación de la membrana.
- 9.2 Las soluciones a las que se les medirá el pH no deben estar por arriba de los 80°C.
- 9.3 Cambiar los buffer se cambian cada semana.



ANEXO II  
DIAGRAMA DEL POTENCIÓMETRO pH METER  
220





**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA VERIFICACION DE TERMOMETROS**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-28

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 1 DE 2

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

1.0 OBJETIVO

Describir la metodología para la verificación de los termómetros utilizados en el laboratorio de Microbiología, comparando el termómetro de uso frente a uno de referencia, para asegurar que las mediciones realizadas con los termómetros no representen un error.

2.0 INTRODUCCIÓN

Los termómetros se utilizan en microbiología para la medida de temperaturas. Los termómetros de bulbo rellenos de líquido pueden llegar a ser de gran fiabilidad, presentando una desviación nominal de tan sólo 0.02°C. Los termómetros empleados habitualmente en el laboratorio suelen alcanzar un error máximo de 1°C.

3.0 DESCRIPCIÓN TÉCNICA

- 3.1 **Marca Comercial:** LAUKA
- 3.2 **Proveedor:** BROKEN THERMOMETERS
- 3.3 **N° de Inventario:** 2CALMIEQTERA
- 3.4 **Fecha de Entrada:** 2004

4.0 EQUIPO REQUERIDO

- 4.1 Aceite mineral
- 4.2 Hielo
- 4.3 Vasos precipitados
- 4.4 Termómetro de referencia (ASTM certificado)
- 4.5 Papel absorbente
- 4.6 Pamilla eléctrica
- 4.7 Agitador magnético

5.0 TÉCNICA

5.1 **VERIFICACIÓN DE LAS TEMPERATURAS CON HIELO.**

- 5.1.1 Colocar en un vaso de precipitados una cantidad de hielo que cubra aproximadamente la mitad de la capacidad del vaso.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
METODO PARA LA VERIFICACION DE TERMOMETROS**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-28

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 2 DE 2

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

5.1.2 Sumergir el termómetro de referencia (ASTM certificado), en el hielo junto con el termómetro a calibrar.

5.1.3 Esperar a que se estabilicen y tomar las temperaturas.

5.1.4 Anotar el valor obtenido en el reporte de "Verificación de Termómetros" FAC-050-00 (Anexo I).

**5.2 VERIFICACIÓN DE TEMPERATURAS CON ACEITE**

5.2.1 Colocar aproximadamente 200 ml de aceite en un vaso de precipitado.

5.2.2 Sumergir el termómetro de referencia (ASTM certificado) y al mismo tiempo el termómetro a calibrar.

5.2.3 Esperar a que se estabilicen y tomar las temperaturas.

5.2.4 Anotar el valor obtenido en el reporte de "Verificación de Termómetros" FAC-050-00 (Anexo I).

**6.0 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

6.1 Comparar la temperatura leída en el termómetro a verificar contra la temperatura del termómetro de referencia para cada una de las muestras utilizadas (hielo y aceite).

6.2 No debe de existir una diferencia mayor o menor de 1°C en los termómetros verificados con respecto al termómetro de referencia.

6.3 Si cumple con la especificación, colocar la etiqueta de aprobado, si no cumple con la referencia colocar la etiqueta de rechazo y apartar de los termómetros en uso.

6.4 La etiqueta debe contener los siguientes datos ( Anexo II):

- a) Identificación del termómetro
- b) Fecha de verificación
- c) Fecha de la próxima revisión
- d) Analista
- e) resultado

6.5 La verificación del termómetro llevar a cabo trimestralmente.

**7.0 ANEXOS**

7.1 Anexo I: Formato del reporte de verificación d termómetros

7.2 Anexo II: Formato de la etiqueta d aprobado de la verificación de termómetros.

**ANEXO I  
FORMATO DE VERIFICACIÓN DE TERMÓMETROS**

**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA  
VERIFICACIÓN DE TERMÓMETROS**

CLAVE: \_\_\_\_\_

FECHA DE REALIZACIÓN \_\_\_\_\_

FECHA DE LA PRÓXIMA CALIBRACIÓN \_\_\_\_\_

CLAVE DEL TERMÓMETRO DE REFERENCIA: \_\_\_\_\_

VERIFICO: \_\_\_\_\_

RESULTADOS

HIELO (°C)

ACEITE (°C)

TERMÓMETRO DE REFERENCIA \_\_\_\_\_

TERMÓMETRO PROBLEMA \_\_\_\_\_

DESVIACIÓN ESTÁNDAR + 1°C \_\_\_\_\_

DESVIACIÓN ACTUAL \_\_\_\_\_

CONCLUSIÓN

ACEPTADO

RECHAZADO

OBSERVACIONES: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**ANEXO II  
FORMATO DE LA ETIQUETA DE VERIFICACIÓN DE**

**VERIFICACIÓN DE TERMÓMETROS**

IDENTIFICACIÓN DEL TERMÓMETRO	_____
FECHA DE VERIFICACIÓN	_____
FECHA DE LA PRÓXIMA VERIFICACIÓN	_____
ANALISTA	_____
RESULTADO	_____

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA EL LAVADO DEL MATERIAL EMPLEADO  
EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA**

NUMERO DE REVISIÓN _____	CÓDIGO PNO-CM-00-29
FECHA DE REVISIÓN: _____	HOJA 1 DE 2

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

1.0 OBJETIVO

Describir los pasos a seguir para el lavado del material utilizado en el laboratorio de microbiología, para garantizar una limpieza total de los mismos, aplicando los correctos detergentes y soluciones sanitizantes.

2.0 INTRODUCCIÓN

La falta de control sobre la limpieza del material puede llevar a la obtención de resultados erróneos difíciles de detectar. El material de vidrio de microbiología nunca debe mezclarse con el de análisis químicos.

3.0 EQUIPO REQUERIDO

- 3.1 Escobillon
- 3.2 Fibra
- 3.3 Agua desmineralizada
- 3.4 Detergente neutro
- 3.5 Detergente dextran
- 3.6 Citricidal 500ppm
- 3.7 Fenoftaleína al 1%
- 3.8 AgNO<sub>3</sub> al 1%
- 3.9 HNO<sub>3</sub> concentrado

4.0 TÉCNICA

LAVADO DE MATERIAL

- 4.1.1 Lavar tubos, matraces, pipetas, frascos y tapas con detergente neutro a 70°C utilizar un escobillon.
- 4.1.2 Lavar las placas de Petri previamente esterilizadas y vasos de precipitado con detergente neutro a 70° y fibra.
- 4.1.3 Enjuagar con agua del grifo a 80°C.
- 4.1.4 Sumergir todo el material en una solución de Citricidal 500 pm durante un minuto.
- 4.1.5 Sacar el material y dejar secar por completo.
- 4.1.6 Si al secarse el material no se encuentra brillante y libre de residuos repetir la operación.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA EL LAVADO DEL MATERIAL EMPLEADO  
EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-29

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 2 DE 2

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

**4.2 TRATAMIENTO ESPECIAL PARA MATERIAL DE LAVADO DIFÍCIL**

4.2.1 Preparar una solución de detergente Extrán.

4.2.2 Hervir el material que contiene residuos de material o compuestos, que con el detergente neutro es imposible de eliminar, en la solución de detergente Extrán durante 15 minutos.

4.2.3 Lavar el material con el detergente neutro, enjuagar con agua de la llave, enjuagar con agua desmineralizada y por ultimo enjugar con Citricidal 500 ppm y sumergir el material en el Citricidal 500 ppm durante un minuto.

4.2.4 Sacar el material y dejar secar por completo.

**4.3 PRUEBA DE CLORUROS**

4.3.1 Preparar una solución de AgNO<sub>3</sub> al 1% y por cada 100 ml agregar 5 gotas de HNO<sub>3</sub> concentrado.

4.3.2 Seleccionar por lo menos una pieza de cada material lavado y adicionar aproximadamente 50 ml de agua desmineralizada.

4.3.3 Agregar 3 gotas de la solución preparada.

4.3.4 Si el material presenta opalescencia no puede ser utilizado.

4.3.5 Volver a lavar el material y aplicar de nuevo la prueba.

4.3.6 Si no aparece opalescencia el material es aceptado para su uso.

**4.4 PRUEBA DE FENOFTALEINA**

4.4.1 Preparar una solución de Fenoftaleina al 1%.

4.4.2 Seleccionar por lo menos una pieza de cada material lavado y agregar una pequeña cantidad de agua desmineralizada.

4.4.3 Agregar a cada pieza 3 gotas de la solución de fenoftaleina.

4.4.4 Si el agua se enturbia o presenta un ligero color rosa significa que el material no ha sido enjuagado correctamente y no podrá ser utilizado para el análisis.

4.4.5 Repetir el enjuague del material con agua desmineralizada y realizar la prueba.

4.4.6 Si el agua no presenta ningún cambio el material es aceptado para ser usado.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA ESTERILIZACIÓN DEL MATERIAL  
EMPLEADO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA**

**NÚMERO DE REVISIÓN** \_\_\_\_\_

**CÓDIGO  
PNO-CM-00-30**

**FECHA DE REVISIÓN:** \_\_\_\_\_

**HOJA 1 DE 2**

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
<b>FIRMA</b>			
<b>NOMBRE</b>			
<b>FECHA</b>			

**1.0**     OBJETIVO

Describir los pasos a seguir para la esterilización del material empleado en el laboratorio de microbiología, para asegurar su utilización sin riesgos de contaminación.

**2.0**     INTRODUCCIÓN

Una de las condiciones para utilizar el material requerido para los análisis microbiológicos es que se encuentren estériles, las condiciones en que se lleva a cabo el proceso depende de cada material.

**3.0**     EQUIPO REQUERIDO

- 3.1     Autoclave marca METRON
- 3.2     Horno eléctrico marca RIOSSA
- 3.3     Porta-pipetas
- 3.4     Porta cajas Petri
- 3.5     Mechero Bunzen

**4.0**     TÉCNICA

**4.1**     **Pipetas**

- 4.1.1    Después de haber lavado y secado las pipetas introducir un tapón de algodón en la parte superior.
- 4.1.2    Colocar una almohadilla hecha de algodón y gasas en el fondo del contenedor de aluminio, para proteger las puntas.
- 4.1.3    Introducir las pipetas con la punta hacia abajo en el contenedor de pipetas.
- 4.1.4    Realizar un ciclo de esterilización en la autoclave marca METRON durante 15 min. a 15 libras o en Horno marca RIOSSA a 180°C por 1 hora 30 minutos a 2 horas.

**4.2**     **Placas Petri**

- 4.2.1    Lavar y secar las placas de Petri.
- 4.2.2    En columnas de 6 acomodar las placas de Petri en el Horno Eléctrico.
- 4.2.3    El ciclo de esterilización debe de ser a 120°C durante 3 horas.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA ESTERILIZACIÓN DEL MATERIAL  
EMPLEADO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA**

<b>NUMERO DE REVISIÓN</b> _____	<b>CÓDIGO PNO-CM-00-30</b>
---------------------------------	--------------------------------

<b>FECHA DE REVISIÓN:</b> _____	<b>HOJA 2 DE 2</b>
---------------------------------	--------------------

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
<b>FIRMA</b>			
<b>NOMBRE</b>			
<b>FECHA</b>			

**4.3 Asas de Inoculación**

- 4.3.1 Las asas de inoculación se deben lijar cuando estas se encuentren oxidadas
- 4.3.2 Antes de ser esterilizadas deben sumergir en una solución de Benzalconio al 5%
- 4.3.3 Para esterilizar se utilizar el mechero de bunsen
- 4.3.4 Exponer el asa a la flama del mechero de bunsen
- 4.3.5 Retirar en cuanto se ponga al rojo vivo el asa de inoculación.

**4.4 ESTERILIZACIÓN DE MATERIAL CONTAMINADO**

- 4.4.1 Colocar el material contaminado o que haya sido utilizado para la identificación de patógenos en el interior del autoclave.
- 4.4.2 Esterilizar a una presión de 15 libras y a una temperatura de 121°C durante 15 minutos para las placas Petri con medio de cultivo y por 30 minutos el material por lavar o desechar.
- 4.4.3 Saque el material de l Autoclave y deseche el agar contenido en las placas de Petri en bolsas de polietileno.
- 4.4.4 Proceder a lavar el material.

**5.0 PRECAUCIONES**

- 5.1 No esterilizar conjuntamente material contaminado con medios de cultivo o material para uso.
- 5.2 Validar los ciclos de esterilización con Indicadores Biológicos siguiendo el Método de Monitoreo de Esterilización por calor Húmedo ó calor seco según corresponda, PNO-CM-00-16 y PNO-CM-00-17 respectivamente.



**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO SÓLIDOS**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
**PNO-CM-00-31**

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 1 DE 1

FIRMA	ELABORO	REVISO	APROBÓ
NOMBRE	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
FECHA			

**1.0 OBJETIVO**

1.1 Establecer las instrucciones para realizar la preparación de los medios de cultivo sólidos, utilizados en los análisis microbiológicos.

**2.0 INTRODUCCIÓN**

2.1 La proliferación de bacterias es el resultado de una interacción compleja de diferentes sustancias alimenticias y principios activos, en la cual intervienen factores físicos como temperatura, presión osmótica, pH, humedad. Los medios de cultivo están compuestos de sustancias químicas definidas exactamente no puede faltar el carbono, nitrógeno y el oxígeno tomado de la atmósfera.

**3.0 MATERIAL Y REACTIVOS**

- |     |               |      |                                |
|-----|---------------|------|--------------------------------|
| 3.1 | Bacula        | 3.6  | Autoclave                      |
| 3.2 | Espátula      | 3.7  | Gasas y algodón.               |
| 3.3 | Probeta       | 3.8  | Agua destilada                 |
| 3.4 | Potenciómetro | 3.9  | Medio de Cultivo deshidratado. |
| 3.5 | Parrilla      | 3.10 | NaOH 1 N                       |
|     |               | 3.11 | HCl 1N                         |

**4.0 TÉCNICA**

- 4.1 Pesar exactamente la cantidad del medio a utilizar.
- 4.2 Agregar la cantidad de agua destilada requerida para hidratar el medio.
- 4.3 Calentar a ebullición, con agitación suave hasta que se forme una solución homogénea.
- 4.4 Determinar su pH y ajustarlo al adecuado. En los medios de cultivo sólidos, la medición del pH (y eventualmente la corrección que fuese precisa) se realiza a 45-50 °C.
- 4.5 Poner al matraz su tapón o un tapón hecho con gasa y algodón.
- 4.6 Colocar una cinta indicadora de esterilidad al matraz,
- 4.7 Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- 4.8 Mantener a temperatura entre 47-50°C en Baño de Agua, para su vaciado en cajas Peri.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO  
LIQUIDOS**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
**PNO-CM-00-32**

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 1 DE 1

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE	Responsable de Microbiología	Jefe de Aseguramiento de Calidad	Director de Producción
FECHA			

1.0 OBJETIVO

1.1 Establecer las instrucciones para poder realizar la preparación de los medios de cultivo líquidos, utilizados en los análisis microbiológicos.

2.0 INTRODUCCIÓN

2.1 La proliferación de bacterias es el resultado de una interacción compleja de diferentes sustancias alimenticias y principios activos, en la cual intervienen factores físicos como temperatura, presión osmótica, pH, humedad. Los medios de cultivo están compuestos de sustancias químicas definidas exactamente no puede faltar el carbono, nitrógeno y el oxígeno tomado de la atmósfera.

3.0 MATERIAL Y REACTIVOS

- |     |               |      |                                   |
|-----|---------------|------|-----------------------------------|
| 3.1 | Bacula        | 3.6  | Autoclave                         |
| 3.2 | Espátula      | 3.7  | Tubos de vidrio con tapa de rosca |
| 3.3 | Probeta       | 3.8  | Agua destilada                    |
| 3.4 | Potenciómetro | 3.9  | Medio de Cultivo deshidratado.    |
| 3.5 | Parrilla      | 3.10 | NaOH 1N                           |
|     |               | 3.11 | HCl 1N                            |

4.0 TÉCNICA

- 4.1 Pesar exactamente la cantidad del medio a utilizar.
- 4.2 Agregar la cantidad de agua destilada o desionizada requerida para hidratar el medio.
- 4.3 Agitar hasta que se forme una solución homogénea.
- 4.4 Determinar su pH y ajustar al adecuado, la medición del pH (y eventualmente, la corrección que fuese) precisa realizarla a temperatura ambiente.
- 4.5 Transferir la cantidad indicada a cada tubo y cerrar.
- 4.6 Colocar una cinta indicadora de esterilidad en los tubos.
- 4.7 Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
DE LA TÉCNICA ECOMÉTRICA  
PARA LA VALIDACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO**

CÓDIGO  
**PNO0-CM-00-33**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 1 DE 3

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

**1.0 OBJETIVO**

1.1 Evaluar la efectividad de los medios de cultivo diferenciales, selectivos e indicadores, comprobando el desarrollo de microorganismos para los cuales han sido diseñados cada medio de cultivo, a partir de pequeños inóculos de microorganismos específicos.

**2.0 INTRODUCCIÓN**

2.1 Este método es sencillo, rápido y de fácil interpretación. Consiste en el desarrollo de colonias típicas o reacciones características, a partir de pequeños inóculos de microorganismos específicos. Es útil para comprobar que el medio de cultivo cumple con los requerimientos necesarios para el desarrollo de microorganismos y que el medio de cultivo no contiene sustancias interferentes para la recuperación de las bacterias de ensayo. Se evalúa la susceptibilidad de los medios de cultivo al desarrollo de microorganismos, así como su resistencia al crecimiento de cepas que no deben desarrollar.

**3.0 MATERIAL Y EQUIPO**

**Cepas de Referencia**

*Cándida albicans* (ATCC 1023331)  
*Aspergillus niger* (ATCC 16404)  
*Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)  
*Escherichia coli* (ATCC 11105, 10536)  
*Salmonella typhi* (LNA 99)  
*Pseudomona aeruginosa* (ATCC 15442,25619)

**Medios de Prueba**

Agar sales manitol  
 Agar Vogel-Johnson  
 Agar cetrimida  
 Agar eosina azul de metileno  
 Agar MacConkey  
 Agar dextrosa Sabouraud

Placas Petri estériles  
 Asa de inoculación  
 Mechero de Bunsen  
 Estufa a 35°C

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
DE LA TÉCNICA ECOMÉTRICA  
PARA LA VALIDACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO**

NUMERO DE REVISIÓN _____	CÓDIGO SCM-AC-00-33
FECHA DE REVISIÓN: _____	HOJA 2 DE 3

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

4.0 TÉCNICA

- 4.1 Sembrar las cepas en 10 mL del medio de enriquecimiento Caldo Infusión Cerebro y Corazón.
- 4.2 Incubar 24 horas a 35°C.
- 4.3 Preparar 6 cajas Petri para cada medio de prueba.
- 4.4 La inoculación se realizara de la siguiente forma:
  - a) Inocular 3 cajas de cultivo con cepas que tengan un excelente crecimiento en esos medios.
  - b) Inocular 3 cajas de cultivo con cepas que el medio inhiba su crecimiento o tengan un desarrollo pobre.
- 4.5 Dividir la caja de cultivo en 4 cuadrantes.
- 4.6 Realizar 5 estrías en forma diagonal en cada cuadrante, tomado el inoculo con una asa flameada.
- 4.7 Finalizar con una estría diagonal en el centro Ver Anexo I: Fig. 1.
- 4.8 Incubar 18-24 h a 35°C.

5.0 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- 5.1 El resultado se expresa con un número de 6 cifras, en donde las 3 primeras representan la presencia de crecimiento de las cepas en las estrías o cepas que deben crecer en el medio de cultivo y las otras 3 representan la ausencia de crecimiento de las cepas que no deben crecer.
- 5.2 Si la cepa creció en las 5 estrías de los medios donde se esperaba que creciera se le da un valor de 5 por cada medio de prueba.
- 5.3 Si la cepa no creció en los medios donde se esperaba que no hubiera desarrollo microbiano se le da un valor de 0 para cada medio.  
Así se tendrá la cifra 555000 si el medio es muy selectivo.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
DE LA TÉCNICA ECOMÉTRICA  
PARA LA VALIDACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
**PNO-CM-00-33**

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

**HOJA 3 DE 3**

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

5.4 Son aceptables para un medio selectivo los siguientes resultados:

555 000 **Muy selectivo (Ideal)**  
 554 001 Aceptable y el medio es selectivo  
 544 110 Aceptable y el medio es selectivo

533 221 Más o menos selectivo  
 441 332 Rechazado  
 320 332 Rechazado

Valor de cada estría por cuadrante

1 = 0.2  
 2 = 0.4  
 3 = 0.6  
 4 = 0.8  
 5 = 1.0

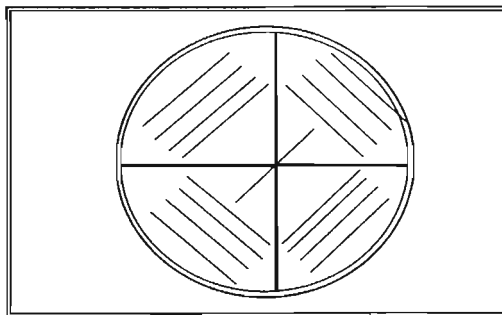
El valor total de cada cuadrante si desarrolló la bacteria en las 5 estrías es = 1  
 El valor total del medio de prueba es de 5 (4 cuadrantes y la línea oblicua del centro).

Si en un cuadrante solo hay desarrollo en 1 estría, el valor es = 0  
 Si en un cuadrante hay desarrollo en 2 estrías, el valor es = 0  
 Si en un cuadrante hay desarrollo en 3 estrías, el valor total del cuadrante es = 1

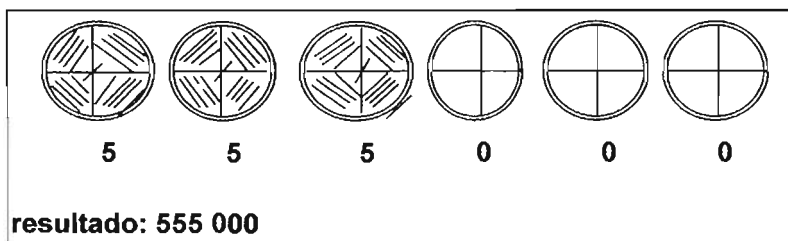
6.0 Ver Anexo I:Fig. 2.

## ANEXO 1:

**Fig. 1.** La caja de cultivo se divide en cuatro cuadrantes, en cada cuadrante se realizara 4 estrias de inoculo y una más en el centro.



**Fig. 2.** Ejemplo de un Medio Selectivo Ideal



**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA RESIEMBRAS DE CEPAS DE REFERENCIA**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-34

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 1 DE 3

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

**1.0 OBJETIVO**

- 1.1 Realizar las resiembras de cada cepa de referencia adecuadamente, evitando cambios de mutación o alguna contaminación, y puedan ser utilizadas en los procedimientos en las que sean requeridas.

**2.0 INTRODUCCIÓN**

- 2.1 La resiembra de cepas es un procedimiento que se efectúa en aquellas cepas de referencia que requieran ser transferidas a medios de cultivo ricos, que permitan el fácil crecimiento de los microorganismos y su conservación en periodos de tiempos prolongados, para ello las resiembras se realizan en intervalos de tiempos establecidos, lo más importante conservar puras las cepas ya que son de referencia y se emplean en los procedimientos normativos de operaciones microbiológicas como controles positivos o negativos según para lo que se requiera.

**3.0 MATERIAL Y EQUIPO**

- 3.1 Asas de inoculación  
 3.2 Tubos de ensayo de 20X 15 mm con agar soya tripticaseína.  
 3.3 Mechero Bunsen  
 3.4 Alcohol etílico al 70%  
 3.5 Incubadora a 35°C

**3.6 CEPAS DE REFERENCIA**

- 3.6.1 *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)  
 3.6.2 *Escherichia coli* (ATCC 11105, 10536)  
 3.6.3 *Salmonella typhi* (LNA 99)  
 3.6.4 *Pseudomona aeruginosa* 15442,25619

**4.0 TÉCNICA**

- 4.1 Incubar los tubos inclinados con Agar Soya Tripticaseína, un día antes de la resiembra a una temperatura de 35°C, para descartar cualquier contaminación del medio.  
 4.2 Esterilizar el asa en la flama del mechero a rojo vivo, enfriar cerca de la flama, introducir el asa al tubo de ensayo que contenga la cepa de referencia.

**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA RESIEMBRAS DE CEPAS DE REFERENCIA**

NUMERO DE REVISIÓN \_\_\_\_\_

CÓDIGO  
PNO-CM-00-34

FECHA DE REVISIÓN: \_\_\_\_\_

HOJA 2 DE 3

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

- 4.3 Dejar enfriar el asa en la parte lateral del tubo y retirar una porción pequeña del cultivo; ya sea por arrastre en caso de bacterias y levaduras, o por desprendimiento en caso de hongos.
- 4.4 Sembrar por estría abierta.
- 4.5 Realizar las resiembras por duplicado para cada microorganismo.
- 4.6 Incubar los tubos a una temperatura de 35°C +/-2°C durante 24-48 horas en caso de bacterias, a 25°C +/-1 °C durante 48 horas en caso de levaduras; a 25°C +/-2°C durante 5días para hongos filamentosos.
- 4.6 Al termino de la incubación observar los tubos si no presentaron alguna contaminación a través de la estría al
- 4.7 **CONFIRMACIÓN DE LA PUREZA**
- 4.7.1 Realizar un frotis y tinción de Gram. a los tubos de cada microorganismo.
- 4.7.2 Realizar un aislamiento mediante la técnica de dilución en medios sólidos y diferenciales. Ver Tabla No. 1
- 4.7.3 Incubar los medios sólidos a la temperatura adecuada como se describe en el punto 4.6 .
- 4.7.4 Al termino de la incubación reportar la morfología colonial realizando una comparación con la Tabla No. 1.
- 4.7.5 Realizar una identificación con los Sistemas de identificación API a los microorganismos que cumplen con la morfología colonial.
- 5.0 **INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**
- 5.1 Si los tubos cumplen con la morfología colonial y microscópica, así como la identificación por el sistema API se aprueba la pureza de la cepa.
- 5.2 Identificar a cada tubo con una etiqueta de resiembra de cepas conforme al Anexo 2.  
A un tubo márkuelo con el numero
- 5.3 La resiembra será mensual a partir del tubo 1.
- 5.4 El tubo Numero 2, se empleara para el trabajo microbiológico rutinario.
- 5.5 Conservar las cepas resemebradas en el refrigerador a una temperatura de 4-10°C, dentro de una bolsa de papel kraft y de plástico.



**PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN  
PARA LA RESIEMBRAS DE CEPAS DE REFERENCIA**

NUMERO DE REVISIÓN _____	CÓDIGO PNO-CM-00-34
FECHA DE REVISIÓN: _____	HOJA 3 DE 3

	ELABORO	REVISO	APROBÓ
FIRMA			
NOMBRE			
FECHA			

5.6 Cuando no se cumpla con la morfología colonial, microscópica y la identificación del Sistema API, la cepa no la puede utilizar como control, la debe de desechar y se solicitara otra nueva.

6.0 REGISTROS

6.1 Bitácora de resiembra de cepas referencia.

7.0 ANEXOS

7.1 Anexo I: Tabla Nom 1.

7.2 Anexo II: Etiqueta de resiembra de cepas

7.3 Anexo III: Registro de resiembra de cepas de referencia

**ANEXO I**  
**TABLA Num. 1 IDENTIFICACIÓN DE COLONIAS**

<b>CEPA</b>	<b>MEDIO DE CULTIVO</b>	<b>MORFOLOGÍA COLONIAL</b>	<b>MORFOLOGIA MICROSCÓPICA</b>
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	Agar Vogel Johnson	Colonias negras rodeadas de una zona amarilla	Cocos gram positivos agrupados en racimos de uva
	Agar sal manitol	Colonias grandes, amarillas rodeadas de una zona amarilla	Cocos gram positivos agrupados en racimos de uva
<b><i>Pseudomona aeruginosa</i></b>	Agar cetrimida	Colonias verdes azulosas, con luz ultravioleta se observan de color verde fluorescente	Bacilos Gram. negativos
<b><i>Salmonella thypi.</i></b>	Agar eosina azul de metileno	Transparentes, color ámbar	Bacilos Gram. negativos
	Agar cetrimida	Colonias grandes blancas o verdes cremosas	Bacilos gram negativos
<b><i>Escherichia coli</i></b>	Agar Mac Conkey	Colonias grandes rosas-rojas, rodeadas de una zona de precipitación	Bacilos gram negativos
	Agar eosina azul de metileno	Colonias de 2-3mm de diámetro, azul negras en la parte central, con brillo verde metálico	Bacilos gram negativos

**ANEXO II**  
**ETIQUETA DE RESIEMBRA DE CEPAS DE**  
**REFERENCIA**

Nombre de la cepa	_____
Fecha de Resiembra	_____
Fecha de Próxima Resiembra	_____
Analizo	_____



## DISCUSION

- La elaboración de los manuales todavía no es una práctica común y esto se debe a tres causas principales:
  1. Que no sean muy conocidas las técnicas y metodologías para elaborar manuales.
  2. Que no reciban la importancia y el apoyo de los niveles directivos.
  3. Que la elaboración y desarrollo de manuales requiere de tiempo de parte de los responsables de cada área, y éste a veces es muy escaso.
- A través del tiempo, del uso real de los manuales de procedimientos y del involucramiento del equipo directivo, se reconoce el valor de toda la información, conocimiento y experiencia allí plasmados.
- Usando adecuadamente métodos y procedimientos escritos, las personas ganan dos cosas: precisión y velocidad. Si la persona es nueva, adicionalmente gana conocimiento y experiencia

## CONCLUSIONES

- Se elaboro un manual de procedimientos normalizados de operación para el laboratorio de microbiología de una industria cosmética, en el cual se documento métodos y técnicas que ofrecen una herramienta para mejorar la organización del laboratorio, así como asegurar calidad.
- Con la realización del manual se tiene una base de información con la que se obtienen datos que permiten estandarizar y aclarar los métodos de trabajo, logrando así disminuir la posibilidad de error y la dispersión de los resultados, al proceder todos los analistas de la misma forma.
- Este manual cumple con las disposiciones marcadas en la NOM-089-SSA1-1994. como lo indica el reglamento de control sanitario.

## BIBLIOGRAFÍA

- 09-25-95 Norma Oficial mexicana NOM-089-SSA1-1994. Bienes y servicios. Métodos para la determinación del contenido microbiano en productos de belleza.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). Sexta edición. México. 1996.
- Bioxon de México. 1990. Manual Bioxon. México, D.F.
- CIPAM. 1988. Guía de procedimientos adecuados de laboratorio analítico. Monografía técnica No. 2. México D.F.
- CIPAM. 1988. Guía de procedimientos adecuados de laboratorio microbiológico. 1988. Monografía técnica No. 4. México D.F.
- Andres Senlee. 1997. ISO9000 en empresas de servicios. Ediciones Gestión 2000. México. 40-52.
- Asociación farmacéutica Politécnica. 1987. Temas Selectos de microbiología farmacéutica. Pág. 20-25.
- Celina Alvear Sevilla. 1999. Calidad total II aseguramiento y mejora continua. Limusa México. Pág. 85-120
- David Hoyle. 1994. ISO9000 Manual de sistemas de calidad. 5ta Edición. Editorial Parafino. Madrid.
- J.B. Wilkinson. R.J. Moore. 1990. Cosmetología de Harry. Editorial Díaz Santos. Madrid Pág. 973-996.
- J. Raúl Martínez Tamariz. 1997. Manual de implantación de un proceso de mejoramiento de la calidad. Editorial Panorama. México. Pág. 2.
- Juan Sabater Tobella. 1988. Buenas practicas de laboratorio y garantía de calidad. Principios Básicos. Editorial Díaz de Santos. Madrid. Pág. 1-39.
- Martín G. Álvarez Torres. 1996. Manual para elaborar manuales de políticas y procedimientos. Editorial Panorama México.
- N.F. Lightfoot. E.A. Mairer. 2002. Análisis microbiológico de alimentos y aguas. Directrices para el aseguramiento de la calidad. Editorial Acribia; S.A. cap 1-5.

- Paloma Ballesteros García. 2002. Introducción a la Química Cosmética. Editorial Safekat Madrid. Pág. 170-186.
- Roge y Stanie John.1996. Microbiología. Editorial Reveste. España.
- [www.correofarmaceutico.com](http://www.correofarmaceutico.com). Redacción de procedimientos normalizados de trabajo.2003
- [www.correofarmaceutico.com](http://www.correofarmaceutico.com). Redacción de procedimientos.
- Arreola G.R. 2000.Microbiología farmacéutica y su aplicación en la industria. Tesis profesional FESC, UNAM, México Edo. de México
- Hernández M. R. 2001. Guía para la Elaboración de Normas Oficiales Mexicanas en materia de insumos para la salud un caso practico; Norma de etiquetado de medicamentos. Tesis profesional FESC, UNAM, México Edo. de México
- Quiroz.L.M.E. 1999. Elaboración de un protocolo de validación , para el proceso de preparación de mezclas intravenosas en un hospital. Tesis profesional FESC, UNAM, México Edo. de México.
- Artículo. La sociedad española de Microbiología y el aseguramiento de calidad microbiológica. Federico Uruburu Fernández. Actualidad. SEM

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**