

como Jefe del Instituto de Desarrollo de Recursos Humanos, por las razones expuestas en la parte considerativa de la presente Resolución, dándosele las gracias por los servicios prestados.

ALAN GARCÍA PÉREZ  
Presidente Constitucional de la República

**Aprueban "Guía Técnica para el Análisis Microbiológico de Superficies en contacto con Alimentos y Bebidas"**

**RESOLUCIÓN MINISTERIAL  
N° 461-2007/MINSA**

Lima, 5 de junio del 2007

Visto: el Expediente N° 06-066910-001, que contiene el Memorandum N° 8358-2006-DG/DIGESA, presentado por la Dirección General de Salud Ambiental;

**CONSIDERANDO:**

Que, el Artículo 92° de la Ley N° 26842, Ley General de Salud dispone que la Autoridad de Salud de nivel nacional es la encargada del control sanitario de los alimentos y bebidas;

Que, el Artículo 2° del Reglamento sobre Vigilancia y Control Sanitario de Alimentos y Bebidas, aprobado por Decreto Supremo N° 007-98-SA dispone que todo alimento y bebida o materia prima debe responder a sus caracteres organolépticos, composición química y condiciones microbiológicas;

Que, mediante Resolución Ministerial N° 410-2006/MINSA del 2 de mayo de 2006, dispuso que la Oficina General de Comunicaciones publique en el portal de internet del Ministerio de Salud, hasta por un período de treinta (30) días naturales, el proyecto de la Guía Técnica sobre Criterios y Procedimientos para el Examen Microbiológico de Superficies en relación con Alimentos y Bebidas, para recepcionar las sugerencias o recomendaciones que pudieran contribuir a su perfeccionamiento;

Que, habiendo culminado dicho plazo, el grupo técnico conformado por representantes de las Direcciones de Salud, Centro Nacional de Alimentación y Nutrición del Instituto Nacional de Salud, Certificaciones del Perú y Laboratorios acreditados, han evaluado y consolidado las sugerencias o recomendaciones presentadas por los recurrentes;

Que, el citado proyecto de Guía Técnica, propone regular un aspecto técnico normativo, estandarizando y uniformizando los procedimientos que se deben aplicar en la selección, toma de muestras y ensayos microbiológicos, estableciendo los límites microbiológicos destinados a evaluar las condiciones higiénicas sanitarias de las superficies vivas e inertes que entran en contacto con los alimentos y bebidas;

Con la opinión favorable de la Dirección General de Salud Ambiental;

Con el visado del Viceministro de Salud, la Directora General de Salud Ambiental y el Director General de la Oficina General de Asesoría Jurídica; y,

De conformidad con lo previsto en el Artículo 8° literal 1) de la Ley N° 27657, Ley del Ministerio de Salud;

**SE RESUELVE:**

**Artículo 1°.-** Aprobar la "Guía Técnica para el Análisis Microbiológico de Superficies en contacto con Alimentos y Bebidas", que consta catorce (14) folios y que forma parte integrante de la presente resolución.

**Artículo 2°.-** La Oficina General de Comunicaciones publicará la mencionada Guía Técnica en el Portal del Internet del Ministerio de Salud.

Regístrese, comuníquese y publíquese.

CARLOS VALLEJOS SOLOGUREN  
Ministro de Salud

69199-1

**Aprueban Documento Técnico: Plan Nacional de Prevención y Control de la Transmisión Madre Niño del VIH y Sífilis**

**RESOLUCIÓN MINISTERIAL  
N° 463-2007/MINSA**

Lima, 5 de junio del 2007

Visto: el Expediente N° 07-043201-DGSP/MINSA;

**CONSIDERANDO:**

## GUÍA TÉCNICA PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE SUPERFICIES EN CONTACTO CON ALIMENTOS Y BEBIDAS

### 1. Finalidad

La presente Guía Técnica tiene por finalidad contribuir a asegurar la calidad sanitaria indispensable en la fabricación, elaboración y expendio de alimentos y bebidas destinados al consumo humano y a la implementación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (HACCP: Hazard Analysis and Critical Control Points).

### 2. Objetivos

2.1. Uniformizar los procedimientos que se deben aplicar en la selección, toma de muestras y para los análisis microbiológicos de superficies vivas e inertes.

2.2. Establecer los límites microbiológicos para evaluar las condiciones higiénicas sanitarias de las superficies vivas e inertes que entran en contacto con los alimentos y bebidas.

2.3. Proporcionar a la Autoridad Sanitaria un instrumento para evaluar la efectividad de los Programas de Higiene y Saneamiento (PHS) y de Buenas Prácticas de Higiene en la manipulación de los alimentos.

### 3. Ámbito de aplicación

La presente Guía Técnica es de obligatorio cumplimiento en todo el territorio nacional, para efectos de vigilancia y control sanitario por parte de la Autoridad Sanitaria, según el ámbito de su competencia. Asimismo, la presente Guía Técnica podrá ser utilizada referencialmente por personas naturales o personas jurídicas en las operaciones de control sanitario que realicen.

### 4. Procedimientos a estandarizar

La presente Guía Técnica estandariza los procedimientos para la selección, toma de muestras y análisis microbiológicos; y establece los límites microbiológicos para superficies que están en contacto o relación directa con los alimentos.

### 5. Definiciones Operativas

**Análisis microbiológico:** Procedimiento que se sigue para determinar la presencia, identificación, y cantidad de microorganismos patógenos e indicadores de contaminación en una muestra.

**Calidad sanitaria:** Es el conjunto de requisitos microbiológicos, físico-químicos y organolépticos que debe cumplir un alimento para ser considerado inocuo y apto para el consumo humano.

**Límites microbiológicos:** Son los valores permisibles de microorganismos presentes en una muestra, que indican la aceptabilidad higiénico sanitaria de una superficie.

**Gel refrigerante:** Producto acumulador de frío, de descongelamiento retardado, no tóxico, no comestible y reutilizable que se emplea para mantener la cadena de frío.

**Hisopo:** Instrumento que tiene un extremo recubierto de algodón o de rayón estéril que se utiliza humedecido con solución diluyente para facilitar la recuperación bacteriana, en el muestreo de superficies.

**Manipulador de alimentos:** Toda persona que a través de sus manos toma contacto directo con alimentos envasados o no envasados, equipos y utensilios utilizados para su elaboración y preparación o con superficies que están en contacto con los alimentos.

**Peligro:** Agente biológico, químico o físico presente en un alimento o superficie que está en contacto con los alimentos y que pueden ocasionar un efecto nocivo para la salud.

**Riesgo:** Probabilidad de que ocurra un efecto nocivo para la salud y la gravedad de dicho efecto, como consecuencia de un peligro o peligros en los alimentos, ocasionado por el contacto con superficies vivas (manipulación) o inertes contaminadas.

**Superficies inertes:** Son todas las partes externas y/o internas de los utensilios que están en contacto con los alimentos, por ejemplo equipos, mobiliario, vajilla, cubiertos, tabla de picar, etc.

**Superficies vivas:** Las partes externas del cuerpo humano que entran en contacto con el equipo, utensilios y alimentos durante su preparación y consumo. Para efectos de la presente Guía se considera a las manos con o sin guantes del manipulador de alimentos.

**Vigilancia sanitaria:** Conjunto de actividades de observación y evaluación que realiza la Autoridad Sanitaria sobre las condiciones sanitarias de las superficies que están en contacto con los alimentos y bebidas, en protección de la salud de los consumidores.

## **6. Conceptos Básicos**

### **6.1. Operaciones en campo**

Las operaciones en campo son aquellas que se realizan en el establecimiento donde se procesan, elaboran, almacenan, fraccionan o expenden alimentos y bebidas, sea fábrica, almacén, servicios de alimentos, quiosco, puesto, comedor, u otro.

Comprende las siguientes operaciones consecutivas, realizadas por personal capacitado en la materia:

- a. Procedimiento para la selección de la muestra.
- b. Selección del método de muestreo.
- c. Procedimiento para la toma de muestra.

### **6.2. Operaciones analíticas**

Las operaciones analíticas son aquellas que se realizan en un laboratorio destinado y acondicionado para el control de la calidad sanitaria e inocuidad de los alimentos y bebidas.

Comprende las siguientes operaciones consecutivas, realizadas por personal capacitado en la materia:

- a. Determinación de los ensayos microbiológicos.
- b. Procedimiento de análisis microbiológicos.
- c. Cálculo y expresión de resultados.
- d. Interpretación de resultados de acuerdo a los límites microbiológicos.

## **7. Consideraciones Específicas: Operaciones en Campo**

### **7.1. Procedimiento para la selección de la muestra**

El procedimiento para seleccionar las muestras, debe estar en función de los riesgos sanitarios relacionados a las diferentes etapas de la cadena alimentaria, sea la de fabricación, la de elaboración y/o expendio.

#### **En fábricas de alimentos y bebidas**

##### **a) Superficies inertes**

Se seleccionarán aquellas que están o tendrán contacto directo con los alimentos que no serán sometidos a un proceso térmico posterior u otro que disminuya la carga microbiana.

**b) Superficies vivas**

Se seleccionarán a los manipuladores de alimentos, con o sin guantes, que estén en contacto directo con los alimentos que no serán sometidos a un proceso térmico posterior u otro tratamiento que disminuya la carga microbiana.

**En establecimientos de elaboración y expendio**

**a) Superficies inertes**

Se seleccionarán aquellas superficies que están en contacto con los alimentos destinados al consumo directo, como utensilios, vajilla, superficies de corte, menaje, equipos, entre otros.

**b) Superficies vivas**

Se seleccionarán las manos de los manipuladores, con o sin guantes, que estén en contacto con los alimentos destinados al consumo directo.

**7.2. Selección del método de muestreo**

La selección del método de muestreo debe estar en función de las características de la superficie a muestrear.

<b>MÉTODO DE MUESTREO</b>	<b>SUPERFICIES A MUESTREAR</b>
<b>Método del Hisopo</b>	Se utiliza para superficies inertes regulares e irregulares, tales como tabla de picar, bandejas, mesas de trabajo, utensilios, cuchillas de equipos, cortadora de embutidos, cortadora de pan de molde, fajas transportadoras, tolvas, mezcladoras, pisos, paredes y otros.
<b>Método de la Esponja</b>	El método de la esponja se utiliza preferentemente para muestrear superficies de mayor área.
<b>Método del Enjuague</b>	Se utiliza para superficies vivas (manos) y para objetos pequeños o para el muestreo de superficies interiores de envases, botellas, bolsas de plástico, etc.

**7.3. Procedimiento para la toma de muestra**

**7.3.1. Método del hisopo**

**a) Descripción:**

Consiste en frotar con un hisopo estéril previamente humedecido en una solución diluyente, el área determinada en el muestreo.

**b) Materiales:**

- Hisopos de algodón u otro material equivalente, de largo aproximado de 12 cm.
- Tubo de ensayo con tapa hermética conteniendo 10 mL de solución diluyente estéril. Se agregará una solución diluyente con neutralizante como alternativa. (Ver Anexo 1).
- Plantilla estéril, con un área abierta en el centro de 100 cm<sup>2</sup> (10cm x 10cm) o alternativamente, plantilla estéril, con un área abierta en el centro de 25 cm<sup>2</sup> (5 cm x 5 cm).
- Guantes descartables de primer uso.
- Protector de cabello.

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

**c) Procedimiento:**

1. Colocar la plantilla (10cm x 10cm) sobre la superficie a muestrear.
2. Humedecer el hisopo en la solución diluyente y presionar ligeramente en la pared del tubo con un movimiento de rotación para quitar el exceso de solución.
3. Con el hisopo inclinado en un ángulo de 30°, frotar 4 veces la superficie delimitada por la plantilla, cada una en dirección opuesta a la anterior. Asegurar el hisopado en toda la superficie.
4. En el caso de utilizar la plantilla de 5cm x 5cm, repetir esta operación 3 veces más, en lugares diferentes de la misma superficie, para obtener 100 cm<sup>2</sup>.
5. Colocar el hisopo en el tubo con la solución diluyente, quebrando la parte del hisopo que estuvo en contacto con los dedos del muestreador, la cual debe ser eliminada.
6. Para superficies irregulares, en el caso de utensilios, se repetirá la operación con 3 utensilios más (total 4 como máximo), con el mismo hisopo, considerando el área que está en contacto con el alimento o con la boca.
7. Si no se toman las 4 muestras, se debe anotar en la Ficha de Toma de Muestra.

**d) Conservación y Transporte de la muestra**

Las muestras se colocarán en un contenedor isotérmico con gel refrigerante, el cual se distribuirá uniformemente en la base y en los laterales, para asegurar que la temperatura del contenedor no sea mayor de 10°C, a fin de asegurar la vida útil de la muestra hasta su llegada al laboratorio. El tiempo de transporte entre la toma de muestra y la recepción en el laboratorio estará en función estricta de dicha temperatura, no debiendo exceder las 24 horas y excepcionalmente las 36 horas.

Se deberá registrar la temperatura del contenedor al colocar las muestras y a la llegada al laboratorio con la finalidad de asegurar que las mismas hayan sido transportadas a la temperatura indicada. Las temperaturas superiores a 10°C invalidan la muestra para su análisis.

### 7.3.2. Método de la esponja

**a) Descripción:**

Consiste en frotar con una esponja estéril, previamente humedecida en una solución diluyente, el área determinada en el muestreo.

**b) Materiales:**

- Esponja estéril de poliuretano o de celulosa, de 5cm x 5 cm.
- Plantilla estéril, con un área en el centro de 100 cm<sup>2</sup> (10 cm x 10 cm).
- Frascos con tapa rosca de 250 mL de capacidad, con 100 mL de solución diluyente estéril.
- Pinzas estériles.
- Bolsas de polietileno de primer uso.
- Guantes descartables de primer uso.
- Protector de cabello.
- Mascarillas descartables.
- Plumón marcador indeleble (para vidrio).
- Caja térmica.
- Refrigerantes.

**c) Procedimiento:**

1. Retirar la esponja de su envoltura con la pinza estéril o con guantes descartables o bien usar una bolsa de primer uso, invertida a manera de guante.
2. Humedecer la esponja con la solución diluyente estéril (aproximadamente 10 mL).

3. En condiciones asépticas frotar vigorosamente el área a muestrear. En el caso de superficies regulares, frotar el área delimitada por la plantilla y en las superficies irregulares (cuchillas, equipos, utensilios, etc), frotar abarcando la mayor cantidad de superficie.
4. Colocar la esponja en el frasco con el resto de la solución diluyente o alternativamente colocar la esponja con la muestra en una bolsa de plástico de primer uso.
5. Para el caso específico de utensilios se deberá repetir la operación con 3 utensilios más (total 4 como máximo), con la misma esponja, considerando el área que está en contacto con el alimento o con la boca.
6. Las tazas, copas o vasos se muestrearán 2 a 3 cm alrededor del borde por dentro y por fuera.

**d) Conservación y Transporte de la muestra**

Las muestras se colocarán en un contenedor isotérmico con gel refrigerante, el cual se distribuirá uniformemente en la base y en los laterales, para asegurar que la temperatura del contenedor no sea mayor de 10°C, a fin de asegurar la vida útil de la muestra hasta su llegada al laboratorio. El tiempo de transporte entre la toma de muestra y la recepción en el laboratorio estará en función estricta de dicha temperatura, no debiendo exceder las 24 horas y excepcionalmente las 36 horas.

Se deberá registrar la temperatura del contenedor al colocar las muestras y a la llegada al laboratorio con la finalidad de asegurar que las mismas hayan sido transportadas a la temperatura indicada. Las temperaturas superiores a 10 °C invalidan la muestra para su análisis.

**7.3.3. Método del enjuague**

**a) Descripción:**

Dependiendo de la muestra, el método consiste en realizar un enjuague (botellas, frascos, utensilios, similares) o inmersión (manos, objetos pequeños) en una solución diluyente.

**b) Materiales:**

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

**c) Procedimiento:**

**Para manos**

1. Vaciar el diluyente del frasco (100 mL) en una bolsa plástica de primer uso.
2. Introducir las manos a muestrear hasta la altura de la muñeca.
3. Solicitar al manipulador que realice un frotado de los dedos y particularmente alrededor de las uñas y la palma de la mano, adicionalmente el muestreador deberá realizar la misma operación a través de las paredes de la bolsa, durante un (01) minuto aproximadamente.
4. Luego de retirar las manos se regresa el líquido al frasco o se anuda la bolsa y ésta se coloca en otra bolsa para que esté segura; en este caso, la bolsa que se utilice debe ser estéril.

**Para recipientes** (frascos, jarras, otros)

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

**Para objetos pequeños** (piezas de equipos, otros)

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

**d) Conservación y Transporte de la muestra**

Las muestras se colocarán en un contenedor isotérmico con gel refrigerante, el cual se distribuirá uniformemente en la base y en los laterales, para asegurar que la temperatura del contenedor no sea mayor de 10°C, a fin de asegurar la vida útil de la muestra hasta su llegada al laboratorio. El tiempo de transporte entre la toma de muestra y la recepción en el laboratorio estará en función estricta de dicha temperatura, no debiendo exceder las 24 horas y excepcionalmente las 36 horas.

Se deberá registrar la temperatura del contenedor al colocar las muestras y a la llegada al laboratorio con la finalidad de asegurar que las mismas hayan sido transportadas a la temperatura indicada. Las temperaturas superiores a 10°C invalidan la muestra para su análisis.

**8. Consideraciones Específicas: Operaciones Analíticas**

**8.1. Selección de ensayos**

Los ensayos a realizar serán según el tipo de superficie que ha sido muestreada.

ENSAYOS	SUPERFICIES VIVAS	SUPERFICIES INERTES
Indicadores de Higiene	Coliformes totales	Coliformes totales
	<i>Staphylococcus aureus</i> (*)	—

(\*) En el caso de superficies el *S. aureus* es considerado un indicador de higiene ya que la toxina es generada en el alimento.

Se considerará la búsqueda de patógenos tales como: *Salmonella* sp., *Listeria* sp., *Vibrio cholerae*, en caso signifiquen un peligro para el proceso. Para la detección de patógenos se deberá tomar una muestra diferente (de la misma superficie) a la muestreada para indicadores de higiene.

**8.2. Procedimiento para el control microbiológico con aplicación del método del hisopo**

**Procedimiento de análisis microbiológicos**

Sea por métodos rápidos o convencionales, los ensayos microbiológicos se realizarán utilizando métodos normalizados por organismos internacionales como la Organización Internacional para la Estandarización (ISO: Internacional Organization for Standardization), Métodos Oficiales de Análisis de la Asociación Internacional de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC: Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International), Administración de Alimentos y Drogas/Manual Analítico Bacteriológico (FDA/BAM: Food and Drug Administration/Bacteriological

Analytical Manual), Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF: Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods), Asociación Americana para la Salud Pública / Compendio de Métodos para el Análisis Microbiológico de Alimentos (APHA/CMMEF: American Public Health Association / Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods), entre otros; utilizando la técnica de recuento en placa.

### Cálculo y expresión de resultados

#### a) Cálculo

Para superficies regulares: el número de colonias obtenidas (ufc) se multiplicará por el factor de dilución y por el volumen de solución diluyente utilizada en el muestreo (10 mL) y se dividirá entre el área de la superficie hisopada o muestreada (100 cm<sup>2</sup>).

Para superficies irregulares: el número de colonias obtenido (ufc) se multiplicará por el factor de dilución y por el volumen de la solución diluyente usada.

#### b) Expresión de resultados

Los resultados se expresarán:

- Para superficies regulares en: ufc / cm<sup>2</sup>;
- Para superficies irregulares en: ufc/ superficie muestreada (ej. cuchilla de licuadora, cuchara, etc.). Se deberá expresar la cantidad de superficies muestreadas. (ej. ufc/ 4 cucharas).

#### c) Interpretación de resultados de acuerdo a los límites microbiológicos

SUPERFICIES INERTES				
MÉTODO HISOPO	Superficie Regular		Superficie Irregular	
ENSAYO	Límite de Detección del Método	Límite Permissible (*)	Límite de Detección del Método	Límite Permissible (*)
<b>Coliformes totales</b>	< 0,1 ufc / cm <sup>2</sup>	< 1 ufc / cm <sup>2</sup>	< 10 ufc / superficie muestreada	< 10 ufc / superficie muestreada
<b>Patógeno</b>	Ausencia / superficie muestreada en cm <sup>2</sup> (**)	Ausencia / superficie muestreada en cm <sup>2</sup> (**)	Ausencia / superficie muestreada	Ausencia / superficie muestreada

(\*) En las operaciones analíticas, estos valores son indicadores de ausencia.

(\*\*) Indicar el área muestreada, la cual debe ser mayor o igual a 100 cm<sup>2</sup>.

### 8.3. Procedimiento para el control microbiológico con aplicación del método de la esponja

#### Procedimiento de análisis microbiológico

Sea por métodos rápidos o convencionales, los ensayos microbiológicos se realizarán utilizando métodos normalizados por organismos internacionales como la ISO, AOAC, FDA/BAM, ICMSF, APHA/CMMEF, entre otros; utilizando la técnica de recuento en placa.



### Cálculo y expresión de resultados

**a) Cálculo**

Para superficies regulares: el número de colonias obtenidas (ufc) se multiplicará por el factor de dilución y por el volumen de solución diluyente utilizada en el muestreo (100 mL) y se dividirá entre el área de la superficie muestreada (100 cm<sup>2</sup>).

Para superficies irregulares: el número de colonias obtenido (ufc) se multiplica por el factor de dilución y por el volumen de solución diluyente utilizado en el muestreo (100 mL) y se divide entre las 4 superficies muestreadas (ej. cuchillas de licuadoras, utensilios como cucharas, vasos, etc.).

**b) Expresión de resultados**

Los resultados se expresarán:

- Para superficies regulares: ufc/ cm<sup>2</sup>
- Para superficies irregulares: ufc/ superficie muestreada (ej. cuchilla de licuadora, cubierto, etc).

**c) Interpretación de resultados de acuerdo a los límites microbiológicos**

SUPERFICIES INERTES				
MÉTODO ESPONJA	Superficie Regular		Superficie Irregular	
ENSAYO	Límite de Detección del Método	Límite Permisible (*)	Límite de Detección del Método	Límite Permisible (*)
<b>Coliformes totales</b>	< 1 ufc / cm <sup>2</sup>	< 1 ufc / cm <sup>2</sup>	< 25 ufc / superficie muestreada (**)	< 25 ufc / superficie muestreada (**)
<b>Patógeno</b>	Ausencia / superficie muestreada en cm <sup>2</sup> (***)	Ausencia / superficie muestreada en cm <sup>2</sup> (***)	Ausencia / superficie muestreada	Ausencia / superficie muestreada

(\*) En las operaciones analíticas, estos valores son indicadores de ausencia.

(\*\*) Para 4 utensilios.

(\*\*\*) Indicar el área muestreada, la cual debe ser mayor o igual a 100 cm<sup>2</sup>.

### 8.4. Procedimiento para el control microbiológico con aplicación del método del enjuague

**Procedimiento de análisis microbiológico**

Sea por métodos rápidos o convencionales, los ensayos microbiológicos se realizarán utilizando métodos normalizados por organismos internacionales como la ISO, AOAC, FDA/BAM, ICMSF, APHA/CMMEF, entre otros; utilizando la técnica de recuento en placa.

### Cálculo y expresión de resultados

**a) Cálculo**

Para superficies vivas: el número de colonias obtenidas (ufc) se multiplicará por el factor de dilución y por el volumen de solución diluyente utilizada en el muestreo (100 mL).

Para objetos pequeños o para el muestreo de superficies interiores de envases, botellas, bolsas de plástico, entre otros, el número de colonias obtenido (ufc) se multiplica por el factor de dilución y por el volumen de solución diluyente utilizado en el muestreo (100 mL) y se divide entre las 4 superficies muestreadas (ej. envases, bolsas de plástico).

**b) Expresión de resultados**

Los resultados se expresarán:

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

**c) Interpretación de resultados de acuerdo a los límites microbiológicos**

SUPERFICIES				
MÉTODO ENJUAGUE	Vivas		Pequeñas o Internas	
ENSAYO	Límite de Detección del Método	Límite Permisible (*)	Límite de Detección del Método	Límite Permisible (*)
<b>Coliformes totales</b>	< 100 ufc / manos	< 100 ufc / manos	< 25 ufc / superficie muestreada (**)	< 25 ufc / superficie muestreada (**)
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	< 100 ufc / manos	< 100 ufc / manos	--	--
<b>Patógeno</b>	Ausencia / manos	Ausencia / manos	Ausencia / superficie muestreada	Ausencia / superficie muestreada

(\*) En las operaciones analíticas, estos valores son indicadores de ausencia.

(\*\*) Para 4 utensilios.

9. ANEXO 1

**Cuadro Referencial sobre Preparación de Medios de Cultivo**

Los siguientes son los medios de uso más frecuente. Existen otros medios reconocidos y validados por organismos internacionales que podrán ser utilizados.

<b>NOMBRE:</b>	<b>AGAR BAIRD-PARKER</b>																						
<b>Descripción y Uso:</b>	Para el aislamiento y la diferenciación de Estafilococos en alimentos y materiales farmacéuticos, según Baird-Parker (1962).																						
<b>Forma de actuación</b>	<p>Este medio de cultivo contiene cloruro de litio y telurito para la inhibición de la flora acompañante, en tanto que el piruvato y la glicocola actúan favoreciendo selectivamente el crecimiento de Estafilococos.</p> <p>Sobre el medio de cultivo, opaco por su contenido en yema de huevo, las colonias de Estafilococos muestran dos características diagnósticas por lipólisis y proteólisis, se producen halos y anillos característicos y, debido a la reducción del telurito a telurio, se desarrolla una colonia negra. La reacción con la yema de huevo y la reducción del telurito se presentan con notable paralelismo con la coagulasa-positiva, y por tanto, pueden utilizarse como índice de esta última.</p> <p>Para una demostración directa de Estafilococos coagulasa-positiva, ha sido recomendado por Stadhouders y col. (1976) el incorporar al medio de cultivo plasma sanguíneo en lugar de yema de huevo.</p> <p>Smith y Baird-Parker (1964) recomiendan añadir sulfametacina para inhibir el crecimiento de <i>Proteus</i>.</p>																						
<b>Composición: (g/L)</b>	<table border="0"> <tr><td>Peptona de caseína</td><td>10,0</td></tr> <tr><td>Extracto de carne</td><td>5,0</td></tr> <tr><td>Extracto de levadura</td><td>1,0</td></tr> <tr><td>Piruvato sódico</td><td>10,0</td></tr> <tr><td>Glicina</td><td>12,0</td></tr> <tr><td>Cloruro de litio</td><td>5,0</td></tr> <tr><td>Agar-agar</td><td><u>15,0</u></td></tr> <tr><td></td><td>58,0</td></tr> </table> <p><b>Aditivos:</b></p> <table border="0"> <tr><td>emulsión de yema de huevo telurito (mL); eventualmente, sulfametacina (g)</td><td>50,0</td></tr> <tr><td></td><td>0,05</td></tr> </table>	Peptona de caseína	10,0	Extracto de carne	5,0	Extracto de levadura	1,0	Piruvato sódico	10,0	Glicina	12,0	Cloruro de litio	5,0	Agar-agar	<u>15,0</u>		58,0	emulsión de yema de huevo telurito (mL); eventualmente, sulfametacina (g)	50,0		0,05	<b>Preparación:</b>	<p>Disolver 58 g en 0,95 litros, esterilizar en autoclave (15 min. a 121° C), enfriar a 45-50°C, añadir mezclando 50 mL de emulsión de yema de huevo telurito y, eventualmente, 50 mg/litro de Sulfametacina. Verter en placas.</p> <p>pH: 6,8 ± 0,2</p> <p>En tanto que el medio de cultivo basal puede guardarse de 1 a 2 meses a 4°C, el medio de cultivo completo, vertido en placas ha de ser utilizado dentro de las 24 horas siguientes a su preparación.</p>
Peptona de caseína	10,0																						
Extracto de carne	5,0																						
Extracto de levadura	1,0																						
Piruvato sódico	10,0																						
Glicina	12,0																						
Cloruro de litio	5,0																						
Agar-agar	<u>15,0</u>																						
	58,0																						
emulsión de yema de huevo telurito (mL); eventualmente, sulfametacina (g)	50,0																						
	0,05																						
<b>Empleo e interpretación:</b>	<p>Diluir convenientemente el material a investigar y extenderlo finamente sobre la superficie del medio de cultivo.</p> <p>Incubación: Desde 24 hasta 48 horas a 37°C.</p> <p>Las colonias de <i>Staphylococcus aureus</i> se presentan negras, lustrosas, convexas, de 1 a 5 mm de diámetro, con borde estrecho blanquecino, rodeado por un halo claro de 2 a 5 mm de anchura. Dentro del halo claro presencia de anillos opacos no visibles antes de las 48 horas de incubación.</p>																						

<b>NOMBRE:</b>	<b>CALDO DE CEREBRO – CORAZÓN (Brain Heart Broth)</b>																
<b>Descripción y Uso:</b>	Para el cultivo de diversos microorganismos patógenos exigentes. Estos medios de cultivo corresponden a las recomendaciones de los Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1992).																
<b>Forma de actuación:</b>	<p>Estos medios de cultivo se basan en el principio del Caldo Rosenow preparado con trozos de cerebro (Rosenow 1919) y son adecuados con trozos el cultivo de muchas bacterias exigentes, como Estreptococos, Pneumococos, Meningococos y otros. Para el cultivo Gonococos hay que añadir líquido ascítico.</p> <p>El Caldo de cerebro-corazón es especialmente adecuado para el cultivo de Estafilococos destinados al ensayo de plasma coagulasa y para la realización de hemocultivos. El crecimiento de gérmenes anaerobios o microaerófilos resulta decisivamente mejorado por la adición al Caldo de pequeñas cantidades de Agar-agar (aprox. 0,05-0,2%).</p> <p>Sobre la base del Agar-cerebro-corazón, Queiroz y col. (1987) desarrollaron un agar selectivo para <i>Campylobacter pylori</i>, denominándolo Medio Belo Horizonte (MBH).</p> <p>El Agar-cerebro-corazón, aparte de su aplicación en el terreno bacteriológico, es adecuado también para el cultivo de hongos patógenos. El crecimiento de la flora bacteriana de acompañamiento puede inhibirse notablemente por adición de 20 UI de Penicilina y 40 ug de Estreptomina por mL de medio de cultivo. Se recomienda la adición de Cicloheximida (0,05 ug/mL) y de Cloranfenicol (0,5 ug/mL) para el aislamiento selectivo de hongos exigentes, especialmente de <i>Histoplasma capsulatum</i> y <i>Blastomyces</i>, a partir de materiales policontaminados objeto de investigación.</p> <p>Este medio de cultivo es menos adecuado para el estudio de las formas hemolíticas (tras adición de sangre), debido a su contenido de glucosa.</p>																
<b>Composición: (g/L)</b>	<table border="0"> <tr> <td>Substrato alimenticio</td> <td>27,5</td> </tr> <tr> <td>(extracto de cerebro, extracto de corazón y peptona)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>D(+)-glucosa</td> <td>2,0</td> </tr> <tr> <td>Cloruro sódico</td> <td>5,0</td> </tr> <tr> <td>Hidrógenofosfato disódico</td> <td>2,5</td> </tr> <tr> <td>Agar</td> <td><u>15,0</u></td> </tr> <tr> <td></td> <td>52,0</td> </tr> </table>	Substrato alimenticio	27,5	(extracto de cerebro, extracto de corazón y peptona)		D(+)-glucosa	2,0	Cloruro sódico	5,0	Hidrógenofosfato disódico	2,5	Agar	<u>15,0</u>		52,0	<b>Preparación:</b>	<p>Disolver 52 g/L (Agar-cerebro-corazón) o bien 37 g/L (Caldo de Cerebro-Corazón) y esterilizar en autoclave (15 minutos a 121°C). pH: 7,4± 0,2</p> <p>Ambos medios de cultivo son ligeramente parduscos. El caldo tiene un aspecto claro, mientras que el agar puede presentar, a veces, opalescencia.</p>
Substrato alimenticio	27,5																
(extracto de cerebro, extracto de corazón y peptona)																	
D(+)-glucosa	2,0																
Cloruro sódico	5,0																
Hidrógenofosfato disódico	2,5																
Agar	<u>15,0</u>																
	52,0																
<b>Empleo e interpretación:</b>	De acuerdo con la correspondiente descripción y uso.																

<b>NOMBRE:</b>	<b>EMULSIÓN YEMA DE HUEVO TELURITO (Egg-yolk Tellurite Emulsión)</b>		
<b>Descripción y Uso:</b>	La emulsión yema de huevo-telurito, se emplea como aditivo en el Agar Baird Parker (base), y posibilita la demostración de la actividad lecitinasa y la reducción del telurito.		
<b>Composición: (g/L)</b>	Yema de huevo estéril 500,00 Cloruro de sodio 4,25 Telurito potásico 2,10 Agua destilada hasta 1000 ml	<b>Preparación:</b>	Agitar el frasco con fuerza para resuspender el posible sedimento formado. 50 mL de la emulsión de yema se mezclan con 950 mL del medio de cultivo esterilizado y enfriado a 45-50 °C. Verter en placas.  Al tomar la emulsión del frasco, cuidar de que se efectúe de forma estéril.  Al contrario que las placas para cuya preparación se añaden por separado la emulsión y el telurito potásico, aquellas placas que se preparan con emulsión yema de huevo-telurito son estables aproximadamente 2 meses almacenadas a 4°C.

<b>NOMBRE:</b>	<b>AGAR-PEPTONA DE CASEÍNA-PEPTONA DE HARINA DE SOJA (TSA)</b>		
<b>Composición: (g/L)</b>	Peptona de caseína 15,0 Peptona de harina de soya 5,0 Cloruro de sodio 5,0 Agar <u>15,0</u> 40,0  pH : 7,3± 0,2	<b>Preparación:</b>	Diluir 40 gramos del medio de cultivo en 1000 ml de agua destilada, dejar reposar por 15 minutos, calentar en baño maría hasta disolver por completo. Distribuir en tubitos de 13 x 100 mm a razón de 3 mL, llevar a esterilizar en autoclave a 121°C, de 15 libras de presión, durante 15 minutos, dejar enfriar. Los tubos destinados al cepario no necesitan inclinación.

<b>NOMBRE:</b>	<b>ROJO VIOLETA BILIS AGAR (VRBA)</b>		
<b>Descripción y Uso:</b>	Agar selectivo para la demostración y numeración de bacterias coliformes, inclusive <i>E. coli</i> , según DAVIS (1951), en agua, leche, helados, carnes y otros alimentos.		
<b>Forma de actuación</b>	El violeta cristal y las sales biliares inhiben el crecimiento sobre todo, de la flora gram-positiva acompañante. La degradación de la lactosa a ácido se pone de manifiesto por el viraje a rojo del indicador de pH Rojo neutro y por una precipitación de ácidos biliares.		
<b>Composición: (g/L)</b>	Extracto de levadura      3,0 Peptona                      7,0 Sales biliares                1,5 Lactosa                        10,0 Cloruro de sodio            5,0 Rojo neutro                  0,03 Cristal violeta               0,002 Agar                            15,0 <hr/> 41,532  pH :7,4 ± 0,1	<b>Preparación:</b>	Disolver 39,5 g/litro y esterilizar con cuidado (30 minutos a vapor fluente). ¡No esterilizar en autoclave! El medio de cultivo preparado es claro y rojizo parduzco.
<b>Empleo e interpretación</b>	Este medio de cultivo se siembra, casi siempre según el procedimiento de vertido en placa. Incubación: 24 horas a 37 °C.		

<b>NOMBRE:</b>	<b>SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (Solución diluyente)</b>		
<b>Composición: (g/L)</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 34 g Agua            1000 mL destilada	<b>Preparación:</b>	Disolver el fosfato en 500 mL de agua destilada y ajustar el pH a 7,2 con hidróxido de sodio 1N. Llevar a un litro con agua destilada.  Esterilizar durante 15 minutos a 121°C. Conservar en refrigeración.  Transferir 1,25 mL de la solución a un matraz aforado, llevar a un litro con agua destilada, ésta última es la solución de trabajo.  Distribuir en frascos con tapa de rosca en volúmenes de 50 ml o las cantidades que se requieren en cada método. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.  Para el análisis de superficies de manos. Transferir 1,25 mL de solución concentrada a un matraz aforado de un litro, agregar un mL de octil fenol etoxilato. Llevar a un litro con agua destilada. Distribuir en frascos en volúmenes de 50 mL. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

<b>NOMBRE:</b>	<b>AGUA PEPTONADA AL 0,1% (Solución diluyente para el procesamiento)</b>		
<b>Composición: (g/L)</b>	Peptona 1g Agua destilada 1000 mL pH: 7,0	<b>Preparación:</b>	Disolver 1 gramo de peptona en 1000 mL de agua destilada. Distribuir en frascos con tapa rosca de 250 mL en volúmenes de 100 mL o las cantidades que se requieren en cada método. Esterilizar durante 15 minutos a 121°C/ 15 libras de presión.

<b>NOMBRE:</b>	<b>TIOSULFATO DE SODIO (Neutralizante )</b>		
<b>Composición: (g/L)</b>	Tiosulfato de sodio 10 g Agua destilada 100 mL	<b>Preparación:</b>	Disolver 10 gramos de tiosulfato de sodio en 100 mL de agua destilada. Para 100 mL de solución diluyente, colocar 0,1 mL de una solución al 10% de tiosulfato de sodio.  Para neutralizar los vestigios de cloro e impedir de esta manera que continúe ejerciendo su acción bactericida y disminuya.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- American Public Health Association. (APHA/CMMEF). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Fourth edition, 2001. U.S.A.
- Codex Alimentariux. Higiene de los Alimentos. Textos Básicos. FAO/OMS. Segunda Edición. Roma, 2002.
- Manual de Microbiología. Merck. 12<sup>th</sup> Edición. Alemania. 2005.
- Norma Internacional. ISO/IEC 17025:2005 (ES). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. Suiza.
- Procedimiento para el examen microbiológico de superficies y utensilios. Q.B.P. Ma.Cristina Parrilla C., Q.B.P. Ofelia Saldate C. Dirección General de Epidemiología. Laboratorio Nacional de Salud Pública. Departamento de Evaluación de Riesgos Microbianos y Parasitarios. México D.F. 1990.