

NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Salud.

MIKEL ANDONI ARRIOLA PEÑALOSA, Comisionado Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y Presidente 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; 4, de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 30., fracciones XXII y XXIV, 13, apartado A, fracciones I y II, 17 bis, 194, fracción I, 195, 197, 199 y 214, de la Ley General de Salud; 38, fracción II, 40, fracciones I, III, VII, XI y XIII, 41 y 47, fracción IV, de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 28, del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 4, 15 y Quinto Transitorio, del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios; 36, del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud, así como 3, fracciones I, literal s) y II, y 10, fracciones IV y VIII, del Reglamento de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, y

CONSIDERANDO

Que en cumplimiento a lo previsto en el artículo 46, fracción I, de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, el 10 de abril de 2013, el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, aprobó el anteproyecto de la presente Norma;

Que con fecha del 6 de mayo de 2013, en cumplimiento a lo previsto por 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, a efecto de que dentro de los sesenta días naturales siguientes a su publicación, los interesados presentaran sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario;

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

Que en atención a las anteriores consideraciones, contando con la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, he tenido a bien expedir y ordenar la publicación en el Diario Oficial de la Federación, de la siguiente:

**NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-210-SSA1-2014, PRODUCTOS Y SERVICIOS.
MÉTODOS DE PRUEBA MICROBIOLÓGICOS. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS
INDICADORES. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS**

PREFACIO

En la elaboración de la presente norma participaron las siguientes Instituciones y Organismos.

SECRETARÍA DE SALUD.

Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.

RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA.

Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Chiapas.

Laboratorio Estatal de Salud Pública Coahuila.

Laboratorio de Análisis de Riesgo del Distrito Federal.

Laboratorio Estatal de Salud Pública de Jalisco.

Laboratorio Estatal de Salud Pública de Morelos.

Laboratorio Estatal de Salud Pública de Nayarit.

Laboratorio Estatal de Salud Pública de Sinaloa.

Laboratorio Estatal de Salud Pública de Sonora.

Laboratorio Estatal de Salud Pública de Tamaulipas.

Laboratorio Estatal de Salud Pública de Tlaxcala.

SERVICIOS DE SALUD DEL ESTADO DE PUEBLA.

Subdirección de Servicios Auxiliares de Diagnóstico y Tratamiento

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

Facultad de Química.

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.

Facultad de Ciencias Biológicas.

CÁMARA NACIONAL DE INDUSTRIALES DE LA LECHE.
Organismo Nacional de Normalización de Productos Lácteos, A.C.

RED DE TERCEROS AUTORIZADOS.

Analysis & Research Lab, S.A. de C.V.

Centro de Capacitación en Calidad Sanitaria, S.A. de C.V.

Centro de Control Total de Calidades, S.A. de C.V.

Centro de Diagnóstico Microbiológico, S.A. de C.V.

Centro Estatal de Laboratorios. Zapopan, Jalisco.

Grupo Cencon Centro de Control, S.A. de C.V.

Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos.

Laboratorio de Control de Calidad de Aguas, Bebidas y Alimentos.

Laboratorio Bio-Tekax.

Laboratorios del Sureste Cencon-Baquin, S.A. de C.V.

Laboratorio Industrial de Control para Alimentos, S.A. de C.V.

Laboratorio Quibimex, S.A. de C.V.

Laboratorios Valdés, S.A. de C.V.

Microlab Industrial, S.A. de C.V.

Silliker México, S.A. de C.V. Unidad Querétaro.

Cámara Nacional de la Industria de Transformación (CANACINTRA). Industria Láctea.

DUPONT, S.A de C.V.

Grupo Jumex, S.A de C.V.

3M México, S.A. de C.V.

ÍNDICE

1. Objetivo y campo de aplicación.
2. Referencias.
3. Definiciones.
4. Símbolos y abreviaturas.
5. Consideraciones generales.
6. Equipos.
7. Medios de cultivo.
8. Cepas de referencia
9. Concordancia con normas internacionales y mexicanas.
10. Bibliografía.
11. Vigilancia de la norma.
12. Vigencia.
13. Apéndices.

Apéndice A Normativo. Método de referencia para el aislamiento de *Salmonella* spp.

Apéndice B Normativo. Método de referencia para la estimación de la cuenta de *S. aureus*.

Apéndice C Normativo. Método de referencia para el aislamiento de *L. monocytogenes*.

Apéndice D Normativo. Método alternativo para la estimación de Enterococos fecales en agua. Técnica de tubos múltiples.

Apéndice E Normativo. Método de referencia "Sustrato cromogénico definido y fluorogénico para determinar Enterococos en agua".

Apéndice F Normativo. Método aprobado para la determinación de Enterococos fecales en agua. Técnica de filtración por membrana.

Apéndice G Normativo. Método aprobado para el monitoreo de Enterococos fecales recomendado para el monitoreo de aguas para uso recreativo.

Apéndice H Normativo. Método aprobado para la estimación de la densidad de Coliformes Fecales y *E. coli* por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua.

Apéndice I Normativo. Método aprobado para la estimación de la densidad de *E. coli* por la técnica del NMP, para productos de la pesca.

Apéndice J Normativo. Método de referencia para la Enumeración de *E. coli* β -glucuronidasa a 44°C utilizando 5-Bromo-4-cloro-Indol β -D-Glucurónido.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma tiene por objeto establecer los métodos generales y alternativos de prueba para la determinación de los siguientes indicadores microbianos y patógenos en alimentos, bebidas y agua para uso y consumo humano:

- *Salmonella* spp.
 - Apéndice A Normativo.
- *S. aureus*.
 - Apéndice B Normativo.
- *L. monocytogenes*.
 - Apéndice C Normativo.
- Enterococos.
 - Apéndice D Normativo.
 - Apéndice E Normativo.
 - Apéndice F Normativo.
 - Apéndice G Normativo.
- Coliformes Fecales.
 - Apéndice H Normativo.
- *E. coli*.
 - Apéndice H Normativo.
 - Apéndice I Normativo.
 - Apéndice J Normativo.

1.2 Esta Norma es de observancia obligatoria en el territorio nacional para las personas físicas o morales que se dedican a efectuar los métodos a que se refiere el punto anterior en alimentos para consumo nacional o de importación y productos de exportación.

2. Referencias

2.1 Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002. Sistema General de Unidades de Medida.

2.2 Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.

3. Definiciones

Para fines de esta Norma se entiende por:

3.1 Caso epidemiológico: al que es reportado por la autoridad sanitaria y se realiza para detectar el agente etiológico de una enfermedad transmitida por alimentos.

3.2 Ciclo de esterilización: a la secuencia de parámetros definidos de operación (por ejemplo: tiempo, temperatura y presión) y las condiciones requeridas para obtener un producto estéril. Un ciclo de esterilización se considera válido cuando el laboratorio cuenta con un programa documentado, que proporciona la seguridad de que todas las unidades esterilizadas cumplen las especificaciones de esterilidad. Siendo un conjunto de ensayos que asegura que el proceso de esterilización funciona en la forma esperada todas las veces que se lleva a cabo.

3.3 Coliformes fecales: a los bacilos cortos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, que fermentan la lactosa con producción de ácido y de gas dentro de las 48h a 44.5°C $\pm$ 0.2°C en agua y a 45.5°C $\pm$ 0.2°C en alimentos usualmente en caldo *E. coli*.

3.4 Colonias: al agrupamiento de células en forma de masas visibles, en un medio sólido que provienen de una unidad formadora de colonia.

3.5 Dilución decimal: a la solución, suspensión o emulsión obtenida después de pesar o medir una cantidad del producto bajo examen y mezclarla con una cantidad de nueve veces en proporción de diluyente.

3.6 Diluciones decimales adicionales: a las suspensiones o soluciones obtenidas al mezclar un determinado volumen de la dilución primaria con un volumen de nueve veces un diluyente y que por repetición de esta operación con cada dilución así preparada, se obtiene la serie de diluciones decimales adecuadas para la inoculación de medios de cultivo.

3.7 *Escherichia coli* (*E. coli*): al microorganismo que está presente en el intestino del hombre y animales de sangre caliente, por lo que su presencia en una muestra de alimento no es deseable ya que indica la presencia de materia fecal. Este microorganismo es miembro de la familia *Enterobacteriaceae* que incluye diferentes géneros de interés sanitario (*Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*, entre otras). La mayoría de los aislamientos de *E. coli* no son considerados como patógenos aunque pueden causar severas infecciones en personas inmunocomprometidas, en niños pequeños y ancianos. Ciertas cepas al ser ingeridas, pueden causar enfermedades gastrointestinales en individuos sanos. Se considera como un microorganismo común en intestino, pero existen cepas patógenas que afectan al ser humano como el serotipo O157:H7, ocasionando graves cuadros clínicos que pudieran ocasionar la muerte. Produce ácido en agar que contenga 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D glucuronido y es β -glucuronidasa positivo incubado a 44°C $\pm$ 1°C por 22h $\pm$ 2h.

3.8 *E. coli* β -glucuronidasa positiva: a la bacteria que a 44°C forma colonias típicas de color azul en el medio tripton-bilis-glucuronido.

3.9 Enterococos intestinales: a los miembros de la familia *Enterococcaceae* que incluye a *E. faecalis*, *E. faecium*, *Enterococcus durans* y *Enterococcus hirae*. Son cocos Gram positivos que al crecer se agrupan en cadenas cortas o en pares de cocos Gram positivos, anaerobios facultativos, inmóviles, catalasa negativos. Al desarrollarse en los medios adecuados son capaces de reducir el 2, 3, 5- trifeniltetrazolio e hidrolizar la esculina a 44°C.

3.10 Grupo Coliforme: a los bacilos cortos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, sin formación de espora, que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas dentro de las 48h cuando se incuban a 35°C.

3.11 Hemólisis: a la zona transparente alrededor de la colonia debida a la lisis total del eritrocito, puede ser hemólisis α , en donde la lisis es parcial, la hemólisis β es una lisis completa.

3.12 *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*): al bacilo corto, Gram positivo, no esporulado, móvil, aerobio facultativo, β -hemolítico catalasa positivo, oxidasa negativa, capaz de crecer en condiciones de microaerofilia o psicofilia.

3.13 Métodos de referencia: a aquéllos utilizados en casos de controversia nacional o internacional y en ausencia de un método aprobado.

3.14 Métodos aprobados: a aquéllos que pueden emplearse para fines de control, inspección, reglamentación o por un programa específico y para decisiones en la protección contra riesgos sanitarios.

3.15 Métodos alternativos aprobados: a aquéllos que se encuentran referidos en las referencias internacionales como AOAC Internacional, AFNOR, ISO, FDA, CODEX, entre otras y que cuentan con validación internacional y verificación en el laboratorio de prueba, sólo pueden ser usados en el análisis del producto para el cual fue validado.

3.16 Mesofílico aerobio: al microorganismo capaz de crecer en presencia de oxígeno y cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 20°C y 37°C.

3.17 *Micrococcus*: al género de bacterias Gram-positivas con células esféricas de diámetro comprendido entre 0.5 y 3 micras que típicamente aparecen en tétradas. *Micrococcus* tiene una gruesa pared celular que puede abarcar tanto como el 50% de materia celular. Su genoma es rico en guanina y citosina, típicamente en porcentaje del 65% al 75% de contenido Guanina-Citosina.

3.18 Muestra: a la cantidad de material que posee todas las características físicas, fisicoquímicas y microbiológicas del producto a evaluar.

3.19 Patógeno: al microorganismo capaz de producir una enfermedad.

3.20 *Salmonella* spp: al bacilo Gram negativo, aerobio o anaerobio facultativo, no esporulado, generalmente lactosa negativa y móvil. Es una bacteria patógena para el hombre y algunos animales.

3.21 *Staphylococcus aureus* (S. aureus): a la bacteria en forma de coco, que mide de 0.8µm a 1.2µm, Gram positiva, anaerobia facultativa, no esporulada, inmóvil, catalasa positiva, capaz de producir toxinas y otras enzimas relacionadas con su patogenicidad.

3.22 Temperatura Ambiental: a la que oscila entre 18°C y 27°C.

3.23 Toxina: a la sustancia de origen microbiano que da lugar a cuadros clínicos bien definidos, en ausencia de microorganismo o que se produce dentro del huésped.

3.24 Unidades Formadoras de Colonias (UFC): a la célula o conjunto de células que dan origen a una colonia en un medio sólido.

4. Símbolos y abreviaturas

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

4.1	ABE	Agar Bilis Esculina.
4.2	ABEA	Agar Bilis Esculina Azida
4.3	AFNOR	Asociación Francesa de Normalización (Por sus siglas en francés Association Française de Normalisation).
4.4	AOAC Internacional	Asociación de Comunidades Analíticas (Por sus siglas en inglés Association of Analytical Communities).
4.5	ASB	Agar Sulfito de Bismuto.
4.6	AST	Agar Soya Trypticasea.
4.7	ASTEL	Agar triptona soya con extracto de levadura.
4.8	ATCC	Colección de Cultivos de Tipo Americano (Por sus siglas en inglés American Type Culture Collection).
4.9	β	Beta.
4.10	BHI	Caldo Infusión Cerebro Corazón.
4.11	Caldo A-1	Caldo de pre enriquecimiento para coliformes.
4.12	caldo EC-MUG	Caldo Escherichia coli - 4-metilumbelliferyl-beta-D-glucuronido.
4.13	Caldo Fraser	Caldo pre-enriquecimiento selectivo secundario.
4.14	Caldo Fraser medio	Caldo pre-enriquecimiento selectivo primario.
4.15	CCaYAC	Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura.
4.16	CENAM	Centro Nacional de Metrología.
4.17	CIP	Colección del Instituto Pasteur (Por sus siglas en inglés The Collection of Institut Pasteur)
4.18	cm	Centímetro.
4.19	CODEX	Normas Alimentarias Internacionales (Por sus siglas en inglés Codex Alimentarius, International Food Standards).
4.20	COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.
4.21	CST	Caldo Soya Trypticaseina.
4.22	CSTEL	Caldo Triptona Soya con Extracto de Levadura.
4.23	CTT	Caldo Tetratiónato sin verde Brillante.
4.24	CO ₂	Dióxido de carbono.
4.25	°C	Grados Celsius.
4.26	°	Grados.
4.27	EC	Caldo <i>E. coli</i> .
4.28	EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
4.29	<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> .
4.30	<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i> .

4.31	EH	Agar Entérico de Hektoen.
4.32	EMB-L	Agar Azul de Metileno de Levin.
4.33	FDA	Administración de drogas y alimentos (Por sus siglas en inglés Foods and Drugs Administration).
4.34	g	Gramos.
4.35	GUD	Beta-glucuronidasa.
4.36	h	Hora.
4.37	HCl	Ácido clorhídrico.
4.38	ICMSF	Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos (Por sus siglas en inglés International Commission on Microbiological Specifications for Foods).
4.39	IMViC	Indol, Rojo de metilo, Voges Proskauer, citrato.
4.40	ISO	Organización Internacional para la Estandarización (Por sus siglas en inglés International Organization for Standardization).
4.41	1/d	Inverso de la dilución.
4.42	KOH	Hidróxido de Potasio.
4.43	L	Litro.
4.44	±	Más menos.
4.45	>	Mayor que.
4.46	<	Menor que.
4.47	µm	Micrómetro.
4.48	Medio MA-1	Medio de pre enriquecimiento para coliformes.
4.49	min	Minuto.
4.50	MKTTn	Caldo de Muller-Kauffmann tetrationato novobiocina.
4.51	mL	Mililitro.
4.52	mm	Milímetro.
4.53	MMGB	Caldo Glutamato con Minerales Modificado.
4.54	MUG	4-metilumbelliferyl-beta-D-glucurónido.
4.55	MU	4-metilumbelliferona.
4.56	N	Normal.
4.57	NaCl	Cloruro de Sodio.
4.58	NCTC	Colección Nacional de Cultivos (Por sus siglas en inglés National Collection of Type Culture).
4.59	nm	Nanómetro.
4.60	NMP	Número Más Probable.
4.61	ONPG	O-Nitrofenil β-D-galactopiranosido.
4.62	PALCAM	Medio PALCAM para determinar <i>Listeria</i> .
4.63	/	Por.
4.64	%	Por ciento.
4.65	pH	Potencial de Hidrógeno.
4.66	<i>R. equi</i>	<i>Rhodococcus equi</i> .
4.67	RM	Rojo metilo.
4.68	RPBI	Residuo Peligroso Biológico Infeccioso.
4.69	rpm	Revoluciones por minuto.

4.70	RVS	Medio de Rappaport-Vassiliadis con soya.
4.71	<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> .
4.72	s	Segundos.
4.73	spp	Especies plurales.
4.74	TBX	Medio Triptona-Bilis-Glucuronido.
4.75	TBGA	Agar bilis glucuronido.
4.76	TSI	Agar triple azúcar y Hierro.
4.77	WHO	Organización Mundial de la Salud (Por sus siglas en inglés World Health Organization).

5. Consideraciones Generales

5.1 Los laboratorios de prueba que realicen estas determinaciones o análisis deberán cumplir con los requisitos establecidos en la Norma Mexicana citada en el punto 2.2, del Capítulo de Referencias de esta Norma.

5.2 Para obtener resultados reproducibles y por lo tanto significativos, es de suma importancia seguir fielmente y controlar cuidadosamente las condiciones en que se llevan a cabo estos métodos.

5.3 Para aquellos casos en los que las personas físicas o morales que soliciten la validación de los métodos que utilicen para fines de control, inspección o programa específico, la COFEPRIS, los validará conforme a lo dispuesto en las "Guías para la aprobación de métodos alternativos", disponibles para su consulta en el portal de internet <http://www.cofepris.gob.mx/TyS/Paginas/Terceros-Autorizados.aspx> <http://www.cofepris.gob.mx>.

5.4 Todo el material que este en contacto con las muestras deberá estar estéril utilizando un ciclo de esterilización validado.

6. Equipos

6.1 Todos los equipos deberán estar incluidos en un programa de calibración, mantenimiento preventivo y verificación, de acuerdo a las características del equipo.

6.2 Los potenciómetros deben tener una precisión de verificación mínima de ± 0.1 pH a 20°C-25°C. Deben verificarse el día de uso con soluciones amortiguadoras trazables al CENAM u otro patrón nacional emitido por un Instituto Nacional de Metrología incorporado al Arreglo de Reconocimiento Mutuo del Comité Internacional de Pesas y Medidas.

6.3 Las balanzas deberán ser verificadas el día de uso utilizando un marco de pesas calibrado o verificado.

6.4 Los equipos para incubación tales como incubadoras y baños de agua, deberán demostrar muestreando diferentes puntos de la cámara, durante un tiempo determinado, que asegure las condiciones de incubación de la prueba que pueden trabajar a los intervalos de temperatura indicados en los métodos.

6.5 Cuando se indique el uso de un termómetro, éste deberá estar dentro de un programa de calibración y/o verificación vigente, esta última contra un termómetro patrón.

6.6 Las autoclaves y hornos, que se utilicen para la esterilización de material y medios de cultivo, deberán contar con instrumentos de medición calibrados. Cada ciclo de esterilización debe estar controlado paramétricamente (temperatura y presión) y con indicadores biológicos o contar con un programa de monitoreo con indicadores biológicos, considerando la frecuencia de uso y las condiciones de mantenimiento. El laboratorio debe contar con ciclos de esterilización que garanticen la esterilidad de los materiales sometidos a esterilización sin afectación de sus características, con el propósito de demostrar la distribución y la penetración del calor.

6.7 Los equipos de incubación deberán contar con termómetros calibrados con división mínima de la mitad de la variación permitida al equipo por el método, por ejemplo cuando se indique una variación de $\pm 1^\circ\text{C}$, el termómetro deberá tener una división mínima de 0.5°C .

6.8 La calibración de los equipos deberá ser trazable a un patrón nacional (CENAM).

7. Medios de Cultivo

7.1 Todos los medios de cultivo deberán usarse hasta haber aprobado el control de calidad adecuado para su uso, con excepción de los medios de cultivo que tengan como restricción el tiempo de uso, en esos casos los resultados del análisis no podrán ser emitidos hasta haber completado el control de calidad de los medios de cultivo.

7.2 Pueden utilizarse medios de cultivo preparados en el laboratorio por ingrediente, medios de cultivo preparado en polvo o listo para su uso, siempre que éstos cumplan con la formulación descrita en el método.

7.3 Debe realizarse control de calidad de los medios de cultivo. De acuerdo a un método científico.

7.4 Los reactivos a emplear en el método objeto de esta Norma deben ser grado analítico.

8. Cepas de referencia

8.1 Debido a la variabilidad inherente de los materiales biológicos es necesario demostrar que las cepas control utilizadas proceden de una colección de microorganismos que asegure la identidad y las características de los microorganismos para su uso como patrones biológicos. Las cepas control utilizadas deberán demostrar trazabilidad a una colección de microorganismos reconocida y deberán demostrar la pureza y viabilidad de las mismas.

9. Concordancia con normas internacionales y mexicanas

Esta Norma es totalmente equivalente con las siguientes normas internacionales.

9.1 Norma Internacional ISO 16649-3. Microbiología de los alimentos y alimento de animales. Método horizontal para el recuento de *E. coli* β -glucuronidasa positivo. Parte 3. Técnica utilizando 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucuronido. Primera edición (2005).

9.2 Norma Internacional ISO 7899-2 Calidad del agua. Detección y enumeración de Enterococos intestinales. Parte 2: Método de Filtración por membrana.

9.3 Norma Internacional ISO 8199 Calidad del agua. Guía general sobre la enumeración de microorganismos por cultivo. (06-2005).

9.4 Norma Internacional ISO 11290 Microbiología de los alimentos y alimento para animales - Método horizontal para la detección y recuento de *L. monocytogenes*. Parte 1: Método de detección. 1a. edición (1996). **9.5** Norma Internacional ISO 6888. Microbiología - Guía general para la enumeración de *S. aureus* - técnica de recuento de colonias, 1a. edición (05-1983).

9.6 Norma Internacional ISO 6579 Microbiología de los alimentos y alimento para animales - Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. 4a. edición (2002).

10. Bibliografía

10.1 Asociación Americana de Salud Pública. Métodos Estándar para el Análisis de Aguas y Aguas Residuales. 21a. edición. Washington, DC. (2005).

10.2 Peter Feng, Stephen D. Weagant, Michael A. Grant. Manual Analítico Bacteriológico, Capítulo 4, La enumeración de *E. coli* y las bacterias coliformes, marzo de 2012. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>.

10.3 Asociación Americana de Salud Pública. Compendio de métodos de análisis microbiológico de los alimentos. 4a. edición de Washington, DC. (2001).

10.4 Asociación Americana de Salud Pública. Procedimientos recomendados para el examen del agua de mar y mariscos. 4a edición. Washington, DC. (1970).

10.5 Asociación Americana de Salud Pública. Métodos estándar para el examen de los productos lácteos. 16ª edición. Washington, DC. (1992).

10.6 Asociación Americana de Salud Pública. Métodos Estándar para el Análisis de Aguas y Aguas Residuales. 20a. edición. Washington, DC. (1998).

10.7 Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas. Manual de Control de Calidad Alimentaria Análisis Microbiológico. 4 revisiones (1992).

10.8 AOAC Método Oficial de Análisis. Métodos microbiológicos. Capítulo 17. 18a. edición (1995).

10.9 AOAC Método Oficial de Análisis. Métodos microbiológicos. Capítulo 17. 18a. edición (2007).

10.10 MacFaddin. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Panamericana (2002).

10.11 Asociación Americana de Salud Pública. Métodos Estándar para el Análisis de Aguas y Aguas Residuales. 21a. edición. Washington, DC. (2005). Págs. 9-10.

10.12 Directiva Europea relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. 98/83/CE.

10.13 Organización Mundial de la Salud. Guías para la calidad del agua potable. Vol. 1, 3a. Edición.

10.14 ASTM Método de prueba Internacional estándar para Enterococos en agua usando Enterolert. D6503-99 (2009).

10.15 EPA de EE.UU. Método 1600: Enterococos en agua por filtración de membrana Usando indoxilo- β -D-glucósido Agar (MEI) (septiembre de 2002).

10.16 FDA EE.UU. Administración de Alimentos y Drogas. Programa Nacional de Sanidad de Moluscos. Guía para el control de los moluscos. Capítulo II. Zonas de cultivo. Sección IV. (2007).

10.17 FSIS USDA MLG 8.08 Aislamiento e identificación de *L. monocytogenes* a partir de carnes rojas, aves de corral y huevos, y muestras ambientales.

10.18 Wallace H. Andrews, Andrew Jacobson, y Thomas Hammack. Manual Analítico Bacteriológico. Capítulo 5 *Salmonella* 8a. revisión (noviembre de 2011) <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>

10.19 Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006, "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración".

10.20 Norma Internacional ISO/TS 11133-1: 2009 Microbiología de los alimentos y alimento de animales- Directrices para la preparación y producción de medios de cultivo - Parte 1: Directrices generales sobre la garantía de calidad para la preparación de medios de cultivo en el laboratorio (2009).

10.21 Norma Internacional ISO/TS 11133-2: 2003. Microbiología de los alimentos y alimento para animales - Directrices para la preparación y producción de medios de cultivo - Parte 2: Directrices prácticas sobre las pruebas de rendimiento de los medios de cultivo.

10.22 Guía sobre la calificación de equipo de instrumentos analíticos. CENAM. Abril 2004. http://www.cenam.mx/publicaciones/gratuitas/descarga/default.aspx?arch=/GUIA_CALIFICACION_EQUIPOS-2004.pdf

10.23 Guía para la industria, la validación del proceso: Principios y prácticas generales.

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM070336.pdf>

10.24 Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos. Comité de expertos de la OMS en especificaciones de preparaciones farmacéuticas. Reporte 44 Ginebra. Organización Mundial de la Salud. Serie de reportes técnicos No. 957, 2010. http://apps.who.int/prequal/info_general/documents/TRS957/TRS957_annex1_SPANISH.pdf 10.25 Buenas Prácticas de la OMS para los laboratorios farmacéuticos de microbiología. Er/09.297.2 bar. 2010. http://apps.who.int/prequal/info_general/documents/TRS961/TRS961_Annex2.pdf

10.26 Norma Internacional ISO 16649-2 Microbiología de los alimentos y alimento para animales - Método horizontal para el recuento de *E. coli*-glucuronidasa positiva - Parte 2: Técnica de recuento de colonias a 44°C utilizando 5-bromo -4-cloro-3-indol-D-glucurónido. Número de referencia ISO 16649-2: © 2001 (E) ISO 2001.

10.27 Métodos estándar para el examen de agua y aguas residuales. 22a. edición. Asociación Americana de Salud Pública/Asociación Americana de Obras de Agua/Federación Ambiental del Agua. 9230 B. Técnica de Tubos Múltiples.

10.28 Métodos estándar para el examen de agua y aguas residuales. 22a. edición. Asociación Americana de Salud Pública/Asociación Americana de Obras de Agua/Federación Ambiental del Agua. 9230 C. Técnicas de Filtración por membrana.

10.29 Norma Internacional ISO 16649-2 Primera edición 2001-04-15 Microbiología de los alimentos y alimento para animales - Método horizontal para el recuento de *E. coli*-glucuronidasa positiva - Parte 2: Técnica de recuento de colonias a 44°C utilizando 5-bromo-4-cloro-3-indol-D-glucurónido. Número de referencia ISO 16649-2: © 2001 (E) ISO 2001.

11. Vigilancia de la norma

La vigilancia del cumplimiento de esta Norma corresponde a la Secretaría de Salud, a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y a los gobiernos de las Entidades Federativas, en el ámbito de sus respectivas competencias.

12. Vigencia

12.1 Esta Norma entrará en vigor a los 180 días naturales contados a partir del día siguiente al de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

12.2 Los Apéndices Normativos de esta Norma entrarán en vigor en los plazos que se señalan en la siguiente tabla:

Apéndice Normativo	Entrada en Vigor
Apéndices C y J	A los 180 días naturales siguientes a la entrada en vigor de la Norma.
Apéndices H e I	A los 270 días naturales siguientes a la entrada en vigor de la Norma.
Apéndices A, B y F	A los 360 días naturales siguientes a la entrada en vigor de la Norma.
Apéndices D, E y G	A los 450 días naturales siguientes a la entrada en vigor de la Norma.

TRANSITORIOS

PRIMERO.- La entrada en vigor de los Apéndices **C** y **J** Normativos, dejarán sin efectos la Norma Oficial Mexicana y los capítulos de los Apéndices Normativos de las Normas Oficiales Mexicanas siguientes:

- La Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995, Bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 19 de noviembre de 1997.
- El capítulo B.16. MÉTODO DE PRUEBA MICROBIOLÓGICO PARA ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE *L. monocytogenes*. del APÉNDICE NORMATIVO B, de la Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba.

El capítulo B.13 Determinación de *Listeria monocytogenes*, del APÉNDICE NORMATIVO B, de la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

SEGUNDO.- La entrada en vigor de los Apéndices **H** e **I**, Normativos, dejarán sin efectos la Norma Oficial Mexicana y los capítulos de los Apéndices Normativos de las Normas Oficiales Mexicanas siguientes:

- La Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de bacterias Coliformes. Técnica del número más probable, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 19 de octubre de 1995.
- Los capítulos B.2 DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES. TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE y B.6 DETERMINACIÓN DE LA ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD MICROBIANA POR LA TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE. DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES, COLIFORMES FECALIS Y *Escherichia coli* POR LA TÉCNICA DE DILUCIONES EN TUBO MÚLTIPLE, del APÉNDICE NORMATIVO B. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS, de la Norma Oficial Mexicana NOM-131-SSA1-2012, Productos y servicios. Fórmulas para lactantes, de continuación y para necesidades especiales de nutrición. Alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Etiquetado y métodos de prueba.
- Los capítulos B 7.5 Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable y B 7.6 De la estimación de la densidad microbiana por la técnica del número más probable. Determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* por la técnica de diluciones en tubo múltiple, del APÉNDICE NORMATIVO B Métodos de Prueba, de la Norma Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011, Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba., Los capítulos B.12. DETERMINACIÓN DE

BACTERIAS COLIFORMES. TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE y B.17. DE LA ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD MICROBIANA POR LA TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE. DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES, COLIFORMES FECALIS Y *Escherichia coli* POR LA TÉCNICA DE DILUCIONES EN TUBO MÚLTIPLE, del APÉNDICE NORMATIVO B, de la Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba.

- El capítulo B.18 Estimación de la Densidad Microbiana por la Técnica del Número Más Probable de Bacterias Coliformes, Coliformes fecales y *Escherichia coli*, por la Técnica de Diluciones en Tubo Múltiple, del APÉNDICE NORMATIVO B MÉTODOS DE PRUEBA, de la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

TERCERO.- La entrada en vigor de los Apéndices A y B Normativos, dejarán sin efectos las Normas Oficiales Mexicanas y los capítulos de los Apéndices Normativos de las Normas Oficiales Mexicanas siguientes:

- La Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 22 de septiembre de 1995.
- La Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 de septiembre de 1995.
- El capítulo B.4 DETERMINACIÓN DE *Salmonella* EN ALIMENTOS, del APÉNDICE NORMATIVO B. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS, de la Norma Oficial Mexicana NOM-131-SSA1-2012, Productos y servicios. Fórmulas para lactantes, de continuación y para necesidades especiales de nutrición. Alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Etiquetado y métodos de prueba.
- Los capítulos B 7.4 Método para la determinación de *Salmonella* spp. en alimentos y B 7.8 Método para la determinación de *Staphylococcus aureus*, del APÉNDICE NORMATIVO B. MÉTODOS DE PRUEBA, de la Norma Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011, Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de Prueba.
- De la NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba.

Únicamente del APÉNDICE NORMATIVO B, el B.14. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE *Salmonella* EN ALIMENTOS, y el B.15 MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE *Staphylococcus aureus* EN ALIMENTOS.

- De la NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Únicamente del APÉNDICE NORMATIVO B, el B.11 Determinación de *Staphylococcus aureus*, y el B.12 Determinación de *Salmonella* spp.

De la NOM-247-SSA1-2008. Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de prueba. Únicamente del APÉNDICE NORMATIVO B, los numerales, 4. Análisis microbiológico de productos objeto de esta norma; 4.4. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos, y 4.5. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en productos objeto de esta norma.

CUARTO.- La entrada en vigor de la presente Norma deja sin efectos el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-210-SSA1-2002, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos y toxinas microbianas, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 10 de septiembre de 2003.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 3 de octubre de 2014.- El Comisionado Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, **Mikel Andoni Arriola Peñalosa**.- Rúbrica.

13. Apéndices

Apéndice A Normativo.

Método de referencia para el aislamiento de *Salmonella* spp.

Este método es aplicable para la detección de *Salmonella* spp en productos para consumo humano, así como de áreas de producción y manejo de alimentos especialmente en productos donde las condiciones ambientales permiten la contaminación de estos productos por microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae*.

A.1 INTRODUCCIÓN.

Los miembros del género *Salmonella* spp han sido muy estudiados como patógenos cuando se encuentran presentes en los alimentos. El control de este microorganismo depende en cierta medida del método analítico utilizado para su detección.

Este microorganismo fue inicialmente identificado en muestras clínicas y los métodos empleados para estos casos se adaptaron posteriormente para su detección en alimentos. Las modificaciones a los métodos consideraron dos aspectos principales, el primero es el debilitamiento o daño a las células bacterianas presentes en un alimento debido al proceso a que está sujeto (por ejemplo: tratamiento térmico, secado, etc.) y segundo, la variabilidad inherente a la naturaleza del producto bajo estudio.

La determinación de la presencia o ausencia de *Salmonella* spp, en cierta cantidad de masa o volumen específico de producto, se lleva a cabo acorde a lo descrito en el presente método, requiriendo 4 etapas sucesivas. Las cuales son:

- Etapa de pre-enriquecimiento;
- Enriquecimiento selectivo;
- Aislamiento en medios de cultivos selectivos y diferenciales, e
- Identificación bioquímica y confirmación serológica de los microorganismos.

Nota: *Salmonellaspp* puede presentarse en concentraciones bajas y en algunas ocasiones ir acompañada de una gran cantidad de biota microbiana y de otras enterobacterias y otros géneros bacterianos. Es por lo que se hace necesario el pre-enriquecimiento para permitir la detección de un número bajo de bacterias o células estresadas de *Salmonella* spp.

A.2 EQUIPO.

A.2.1 Autoclave;

A.2.2 Horno que alcance 180°C;

A.2.3 Incubadora capaz de operar a 36°C ± 1°C;

A.2.4 Baño de agua capaz de operar a 41.5°C ± 1°C o incubadora capaz de trabajar a 41.5°C ± 1°C;

A.2.5 Baño de agua capaz de operar a 45°C ± 2°C;

A.2.6 Baño de agua capaz de operar a 37°C ± 1°C;

A.2.7 Potenciómetro;

A.2.8 Balanza granataria con sensibilidad de 0.1g verificada el día de uso;

A.2.9 Homogeneizador peristáltico o licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato, con vasos esterilizables (vidrio, aluminio o acero inoxidable);

A.2.10 Equipo de filtración con trampa, y

A.2.11 Bomba de vacío.

A.3 MATERIALES.

A.3.1 Asa de platino, níquel o desechables de aproximadamente 3mm de diámetro o 10µL (microlitros);

A.3.2 Pipetas graduadas o pipetas automáticas, de diferentes capacidades 10mL, 5mL, graduadas respectivamente en divisiones de 0.5mL y 0.1mL protegidas con tapón de algodón;

A.3.3 Pipetas de 1mL, con graduaciones de 0.1mL;

A.3.4 Matraces Erlenmeyer de 500mL y/o capacidad apropiada;

A.3.5 Cajas Petri estériles de vidrio o desechables de diámetro 15mm x 100mm y/o de un diámetro mayor a 140mm;

A.3.6 Cucharas, bisturíes, cuchillos y pinzas;

A.3.7 Tubos de ensaye de 16mm x 150mm y de 20mm x 100mm o de capacidades adecuadas;

A.3.8 Gradillas para tubos de ensaye;

A.3.9 Mecheros Bunsen o Fisher;

A.3.10 Papel Indicador de pH;

A.3.11 Pinzas estériles para membrana;

A.3.12 Matraces Kitazato de 1000mL;

A.3.13 Filtros de membranas estériles de tamaño de poro de 0.45µm, y

A.3.14 Manguera de hule para equipo de filtración.

Nota: El material desechable puede utilizarse como alternativa aceptable a la cristalería reutilizable si cumple las especificaciones adecuadas.

A.4 MEDIOS DE CULTIVO.

A.4.1 Agua Peptonada amortiguada;

A.4.2 RVS;

A.4.3 MKTTn;

A.4.4 XLD;

A.4.5. EH;

A.4.6 ASB;

A.4.7 Agar Verde Brillante;

A.4.8 Agar nutritivo;

A.4.9 TSI;

A.4.10 LIA;

A.4.11 Agar Urea de Christensen;

A.4.12 Medio L-Lisina descarboxilasa;

A.4.13 Solución salina fisiológica;

A.4.14 Caldo Triptona al 1%;

A.4.15 CTT;

A.4.16 CST;

A.4.17 Caldo Nutritivo;

A.4.18 Caldo Dey-Engley;

A.4.19 Leche descremada, y

A.4.20 Caldo Lactosado.

A.5 REACTIVOS.

A.5.1 Reactivos para la reacción VP (α -naftol y KOH);

A.5.2 Reactivos para la reacción de indol. Reactivo de Kovac o Erlich;

A.5.3 Antisero somático (O) polivalente de *Salmonella* spp;

A.5.4 Tolueno;

A.5.5 α -naftol;

A.5.6 Solución de creatina;

A.5.7 KOH;

A.5.8 *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (*S. Typhimurium*);

A.5.9 *Salmonella diarizonae* ATCC 12325. (*S. diarizonae*);

A.5.10 *Salmonella abortus equi* ATCC 9842. (*S. abortus equi*);

A.5.11 ONPG;

A.5.12 Novobiocina (sal sódica);

A.5.13 Yodo;

A.5.14 Yoduro de Potasio;

A.5.15 Alcohol etílico 96%;

A.5.16 4-Dimetilaminobenzaldehído;

A.5.17 HCl, $r = 1.18\text{g/mL}$ a 1.19g/mL ;

A.5.18 2-metilbutan-2-ol;

A.5.19 Cloruro de sodio;

A.5.20 Monohidrato de creatina;

A.5.21 Solución acuosa de verde brillante al 1%;

A.5.22 Tergitol/Aniónico;

A.5.23 Triton X-100;

A.5.24 NaOH 1N;

A.5.25 Alcohol al 70%;

A.5.26 Sulfato Ferroso, y

A.5.27 K_2SO_3 Sulfato de Potasio.

A.6 CONDICIONES DE PRUEBA.

A.6.1 Muestreo.

Es importante que el laboratorio se cerciore de recibir una muestra representativa y que no haya tenido daños o cambios durante el transporte y/o almacenamiento.

El muestreo no es parte del método especificado aquí, es recomendable que las partes involucradas en este punto lleguen a un acuerdo al respecto, pueden utilizarse diversos estándares internacionales tales como los planes de muestreo del CODEX alimentarios o las guías del ICMSF.

A.6.2 Preparación de la muestra de ensayo.

Lineamientos generales para la preparación de las muestras.

A.6.2.1 General.

La preparación de la suspensión inicial requiere 25g de la muestra en 225mL del medio de pre-enriquecimiento, para obtener una dilución 1:10.

En una situación atípica y justificada, si la porción de muestra utilizada en el ensayo es distinta a 25g, se deberá utilizar la cantidad necesaria de medio de pre-enriquecimiento para obtener una dilución 1:10.

En casos excepcionales, cuando es necesario analizar más de una porción de 25g de un lote específico de alimento y teniendo evidencia de que si hay mezcla de tales porciones no afecta el resultado, las muestras pueden ser compuestas; es decir, si 10 muestras de 25g serán examinadas, combinar las 10 porciones para obtener 250g y adicionar 2.25L del caldo de pre-enriquecimiento precalentado a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Sin embargo, se debe tomar en cuenta que para inocular el caldo selectivo RVS y MKTTn aumentarán las porciones de 10mL a 100mL teniendo que inocular 1mL y 10mL respectivamente. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.2 Productos que contienen cacao.

Agregar al agua peptonada amortiguada 50g/L de caseína (no usar caseína ácida) o 100g/L de leche descremada en polvo, incubar a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 2h, añadir 0.018g/L de verde brillante. Continuar como se indica en el punto A.7.

A.6.2.3 Productos ácidos y acidificantes.

Asegurarse de que el pH no se encuentre por debajo de 4.5 durante el pre-enriquecimiento, puede utilizarse agua peptonada amortiguada a doble concentración. En caso de que se requiera subir el pH a más de 4.5 utilizando NaOH 1N, registrar esta cantidad para alcanzar un pH entre 5 y 7. Continuar como se indica en el punto A.7.

A.6.2.4 Preparación de la muestra para moluscos en concha.

En general, deben tomarse un mínimo de 10 a 12 moluscos bivalvos, a fin de obtener una muestra representativa y permitir la selección de animales completos disponibles para su desconche. Con la mayoría de las especies, esto permite una adecuada selección y se obtendrán aproximadamente 200g de licor y carne. Por otro lado diez a doce piezas de ciertas especies pequeñas de moluscos bivalvos, pueden producir mucho menos que 100g de licor y carne por lo que se deben usar de veinte piezas a treinta piezas de estas especies para obtener el peso adecuado.

Limpieza de la concha. Lavarse las manos con agua potable y jabón antes de comenzar. Enjuagar el exceso de suciedad de las conchas y cepillar con un cepillo estéril, ocupando uno para la muestra completa; bajo el chorro de agua potable poniendo particular atención en las hendiduras de las conchas. Colocar las conchas limpias en toallas de papel absorbente o gasas limpias. Desechar los moluscos que tengan las conchas dañadas o con las valvas abiertas.

Remoción del contenido. Lavarse las manos con agua, jabón y enjuagarse con alcohol al 70%. Se puede utilizar guantes para evitar lesionarse. Sostener el molusco en la mano sobre una gasa dirigiendo la unión de las valvas o bisagra hacia el analista apoyándose sobre la mesa. Con un cuchillo desconchador estéril, insertar la punta entre las valvas y hacer palanca para cortar el músculo abductor. Drenar el licor de la concha dentro de un recipiente estéril. Cortar el músculo abductor de las conchas y vaciar el cuerpo del animal dentro del mismo recipiente. Continuar como se indica en el punto A.6.2.5

A.6.2.5 Procedimiento para moluscos, desconchados y congelados.

Pesar el total de la muestra, máximo 200g (carne y licor) y adicionar igual cantidad de agua peptonada amortiguada para obtener una dilución 1:2. Licuar por 2 min. Continuar como se indica en el punto A.7.

A.6.2.6 Yema de huevo en polvo, clara de huevo en polvo, huevo en polvo, leche fluida, leche descremada, leche con 2% de grasa, entera y suero de leche. Mezclas preparadas en polvo (Harinas para pastel, galletas, donas, bísquets y pan) Fórmulas infantiles y alimentos para administración por cánula u oral, que contengan huevo. Si las muestras no están en polvo, agregar 225mL de agua peptonada amortiguada. Si el producto es un polvo, agregar aproximadamente 15mL de agua peptonada y agitar con una varilla de vidrio, cuchara o abate lenguas, hasta obtener una suspensión homogénea. Agregar tres porciones más de 10mL, 10mL y 190mL para un total de 225mL. Agitar suficientemente hasta que la suspensión no contenga grumos. Tapar el frasco y dejar en reposo durante 60 min $\pm$ 5 min a temperatura del laboratorio promedio que oscila entre 18°C y 27°C. Mezclar por agitación, aflojar la tapa a 1/4 de vuelta, e incubar a 36°C $\pm$ 1°C 18h $\pm$ 2h. Continuar como se indica en el punto A.7.2..

A.6.2.7 Huevos.

A.6.2.7.1 Huevo en cascarón. Eliminar cualquier material ajeno adherido a la superficie del cascarón. Desinfección del cascarón: Preparar la solución desinfectante (1:3) que consiste en adicionar tres partes de una solución de etanol o isopropanol al 70% a una parte de solución de yodo/yoduro de potasio. Preparar una solución de alcohol al 70% diluyendo 700mL de etanol al 100% hasta completar un volumen final de 1000mL de agua destilada estéril o bien diluir 700mL de alcohol al 95% con agua destilada estéril hasta completar un volumen final de 950mL. La solución de yodo/yoduro de potasio se prepara como sigue: Pesar 100g de yoduro de potasio y disolver en 200mL-300mL de agua destilada estéril. Adicionar 50g de yodo y calentar suavemente con agitación constante hasta disolver el yodo. Disolver esta solución hasta completar un volumen final de 1000mL de agua destilada estéril y almacenar en una botella ámbar con tapón de vidrio en la oscuridad. Sumergir los huevos en esta solución por al menos 10s, sacarlos y dejar secar al aire. Cada muestra consiste de 20 huevos, en un total de 50 muestras por cada gallinero. Abrir los huevos en condiciones asépticas con guantes estériles y pasar a un recipiente estéril, cambiar guantes entre cada muestra. Evitar que fragmentos del cascarón caigan en el contenedor. Mezclar completamente las yemas y claras con una cuchara o cualquier otro instrumento estéril. Mantener las muestras a temperatura ambiente (20°C-24°C) por 96h $\pm$ 2h. Después de este tiempo, tomar 25mL o 25g de la mezcla anterior y 25mL de un CST de prueba (testigo) en un contenedor de 500mL y agregar 225mL de CST suplementado con sulfato ferroso (35mg de sulfato ferroso a 1000mL de CST). Mezclar bien por agitación. Dejar en reposo durante 60 min $\pm$ 5min a temperatura ambiente. Mezclar nuevamente por agitación y determinar pH con papel indicador. Ajustar el pH, si es necesario, a 6.8 $\pm$ 0.2. Incubar 24h $\pm$ 2h a 36°C $\pm$ 1°C. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.7.2 Huevo entero líquido (homogeneizado). Combinar 15 porciones de 25mL cada una para dar una muestra combinada de 375mL en un matraz Erlenmeyer de 6L. Mantener esta mezcla a temperatura ambiente (20°C - 25°C) por $96\text{h} \pm 2\text{h}$. Después de este tiempo, adicionar 3375mL de CST suplementado con sulfato ferroso. Mezclar bien por agitación. Dejar en reposo durante $60\text{min} \pm 5\text{min}$ a temperatura ambiente. Mezclar nuevamente por agitación y determinar pH con papel indicador. Ajustar el pH, si es necesario, a 6.8 ± 0.2 . Incubar $24\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.7.3 Huevo cocido o hervido (de pollo, pato u otros). Si el cascarón del huevo se encuentra intacto, desinfectar como se describe en el inciso A.6.2.7.1 y separar en condiciones asépticas el cascarón. Pulverizar la yema y la clara y pesar 25g en un matraz Erlenmeyer de 500mL u otro recipiente apropiado. Agregar 225mL CST (sin sulfato ferroso). Mezclar bien por agitación y continuar como se describe para huevo en cascarón. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.8 Leche descremada en polvo y Caseína. Pesar 50g de producto en 1L de agua peptonada amortiguada, incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 2\text{h}$, después de 2h de incubación, adicionar 2mL de solución verde brillante 1% si el alimento tiene alta probabilidad de estar contaminado con microbiota Gram Positivo. Incubar durante $18\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.9 Productos que contienen huevo (pastas, rollos de huevo, macarrones, espagueti), quesos, ensaladas preparadas a base de: jamón, huevo, pollo, atún, pavo; frutas y verduras frescas congeladas o secas; frutas secas, carne, crustáceos (camarones, cangrejo, cangrejo de río, langosta, langostinos) y pescado. De preferencia, no descongelar muestras congeladas, antes de someterlas al análisis. Si la muestra está congelada para obtener una submuestra para el análisis, descongelar en un baño de agua con temperatura controlada y flujo continuo a $45^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ durante 15min, o mantener la muestra durante 18h de 2°C - 5°C . Pesar en condiciones asépticas, 25g de muestra en un vaso de licuadora. Agregar 225mL de agua peptonada amortiguada y licuar por 2 min. Pasar a un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca de 500mL. Mezclar por agitación, aflojar la tapa a 1/4 de vuelta e incubar durante $18\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.10 Levadura seca (levadura activa e inactiva). Pesar en condiciones asépticas, 25g de muestra, en un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca de 500mL. Agregar 225mL de CST. Mezclar bien hasta formar una suspensión homogénea. Dejar en reposo, a la temperatura del laboratorio, durante $60\text{min} \pm 5\text{min}$, con la tapa bien cerrada. Mezclar bien por agitación y determinar pH con papel indicador. Ajustar el pH si es necesario, a 6.8 ± 0.2 . Mezclar bien antes de ajustar el pH final. Aflojar la tapa a 1/4 de vuelta e incubar durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.11 Mezclas para repostería o cremas pasteleras. Pesar en condiciones asépticas, 25g de muestra, en un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca, de 500mL. Agregar 225mL de caldo nutritivo y mezclar bien. Dejar en reposo a la temperatura del laboratorio, durante $60\text{min} \pm 5\text{min}$, con la tapa bien cerrada. Ajustar el pH si es necesario, a 6.8 ± 0.2 mezclar bien, antes de ajustar el pH final. Aflojar la tapa a 1/4 de vuelta e incubar durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.12 Especies.

A.6.2.12.1 Pimienta negra, pimienta blanca, semillas de apio en hojuelas, chile en polvo, cominos, páprika, hojuelas de perejil, romero, semilla de ajonjolí, tomillo y yerbas en hojuelas. Pesar en condiciones asépticas, 25g de muestra, en un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca de 500mL. Agregar 225mL de CST. Mezclar bien. Dejar en reposo con la tapa bien cerrada, durante $60\text{min} \pm 5\text{min}$ a temperatura de laboratorio. Mezclar bien por agitación y determinar pH con papel indicador. Ajustar el pH si es necesario, a 6.8 ± 0.2 . Mezclar bien, antes de ajustar el pH final. Aflojar la tapa a 1/4 de vuelta e incubar durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.12.2 Cebolla en hojuelas, cebolla en polvo, ajo en hojuelas. Pesar en condiciones asépticas, 25g de muestra, en un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca, de 500mL. Pre-enriquecer la muestra en CST adicionado con K_2SO_3 (5g K_2SO_3 por 1000mL de CST, resultando una concentración final de 0.5% de K_2SO_3). Agregar el K_2SO_3 al caldo antes de esterilizar, distribuir en volúmenes de 225mL en matraces Erlenmeyer de 500mL esterilizar a 121°C por 15 min. Después de esterilizar, determinar el pH asépticamente, ajustando de 5 a 7. Incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.12.3 Pimienta de Jamaica, canela, clavo y orégano. Hasta ahora, no se conocen métodos para neutralizar la toxicidad de estas cuatro especias. Lo que se recomienda para su análisis, es diluirlas más allá de su nivel tóxico. En el caso de la pimienta de Jamaica, canela y orégano; preparar diluciones con una relación 1:100 muestra/CST; y para el clavo, una relación 1:1000. En el caso de condimentos en hojas secas, preparar diluciones cuya relación sea mayor a 1:10, debido a las dificultades que se han encontrado para que

el caldo se absorba en productos deshidratados. Analizar estas especias como se describe para la pimienta negra, manteniendo las relaciones muestra/CST, recomendadas. Incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar como se indica en el punto en A.7.2.

A.6.2.13 Dulce, cubierta de dulce (incluyendo chocolate). Pesar en condiciones asépticas, 25g de muestra en un vaso de licuadora u homogeneizador peristáltico tipo Stomacher. Agregar 225mL de leche descremada, reconstituida, estéril y licuar por 2 min. Pasar la mezcla homogeneizada a un frasco de boca ancha, con tapón de rosca de 500mL y dejar en reposo durante $60\text{min} \pm 5\text{min}$, con la tapa bien cerrada, a temperatura del laboratorio. Mezclar bien por agitación y determinar pH con papel indicador y/o potenciómetro. Ajustar el pH si es necesario a 6.8 ± 0.2 . Agregar 0.45mL de solución acuosa de verde brillante al 1% y mezclar bien. Aflojar la tapa a 1/4 de vuelta e incubar durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.14 Coco. Pesar, en condiciones asépticas, 25g de muestra, en un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca, de 500mL o cualquier otro recipiente adecuado. Agregar 225mL de caldo lactosado estéril. Agitar bien y dejar en reposo a la temperatura del laboratorio durante $60\text{min} \pm 5\text{min}$, con la tapa bien cerrada. Mezclar bien por agitación y determinar pH con papel indicador. Ajustar el pH si es necesario, a 6.8 ± 0.2 . Agregar hasta 2.25mL de Tergitol/Aniónico (pasado por vapor fluente durante 15min) y mezclar bien. Alternativamente se puede usar Triton X-100 (pasado por vapor fluente durante 15min). Limitar el uso de estos surfactantes a la cantidad mínima necesaria para evitar la formación de espuma. En el caso de Triton X-100, con dos gotas a tres gotas es suficiente. Aflojar la tapa a 1/4 de vuelta e incubar durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.15 Colorantes y sustancias coloridas para alimentos. En el caso de colorantes con pH mayor a 6.0 (suspensiones acuosas al 10%), aplicar el método descrito para huevo entero desecado.

A.6.2.16 Colorante (lacas) o colorantes con pH abajo de 6.0. Pesar en condiciones asépticas, 25g de muestra en un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca de 500mL o cualquier otro recipiente adecuado. Agregar 225mL de CTT sin verde brillante. Mezclar bien por agitación y determinar pH con papel indicador. Ajustar el pH. Agitar bien y dejar en reposo a la temperatura ambiente durante $60\text{min} \pm 5\text{min}$, con la tapa bien cerrada. Ajustar el pH a 6.8 ± 0.2 y agregar 2.25mL de solución al 0.1% de verde brillante mezclar completamente, por agitación. Aflojar la tapa a 1/4 de vuelta e incubar durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.17 Gelatina. Pesar, en condiciones asépticas, 25g de muestra, en un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca, de 500mL o cualquier otro recipiente adecuado. Agregar 225mL de agua peptonada amortiguada estéril, agregar 5mL de solución acuosa de papaína al 5% y mezclar bien. Colocar la tapa bien cerrada e incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $60\text{min} \pm 5\text{min}$. Mezclar bien y aflojar la tapa a 1/4 de vuelta e incubar durante $18\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.18 Carnes, substitutos de carne, productos cárnicos, sustancias de origen animal, glándulas y otros alimentos (pescado, carne y hueso). Pesar, en condiciones asépticas, 25g de muestra, en un vaso de licuadora. Agregar 225mL de agua peptonada amortiguada estéril y licuar por 2min. Aflojar la tapa a 1/4 de vuelta e incubar durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.19 Ancas de rana. Colocar 15 pares de ancas de rana en una bolsa de plástico estéril y cubrirlas con agua peptonada amortiguada en una proporción 1:9 muestra/caldo (g/mL). Si se estima que un solo par de ancas, pesa un promedio de 25g o más, analizar un solo par, por cada 15 pares. Colocar la bolsa en un vaso de plástico grande o cualquier otro recipiente. Incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar el análisis, como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.20 Conejo en canal. Introducir el conejo en una bolsa de plástico estéril y colocarlo en un vaso u otro contenedor de tamaño suficiente para sumergir la canal. Adicionar agua peptonada amortiguada en una proporción 1:9 muestra/caldo (g/mL) para cubrir la muestra. Mezclar bien con agitación. Incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar el análisis como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.21 Jugo de naranja (pasteurizado y sin pasteurizar), jugo de manzana (pasteurizado y sin pasteurizar). En condiciones asépticas, agregar 25mL de la muestra y 225mL de agua peptonada amortiguada, en un frasco de boca ancha estéril, con tapa de rosca de 500mL u otro recipiente apropiado. Agitar para mezclar completamente. Incubar con la tapa suelta por $18\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.22 Orejas de puerco. Colocar en un bolsa de plástico una pieza (de dos a tres piezas si éstas son pequeñas) por cada unidad analítica. Introducir la bolsa en un vaso o en un contenedor adecuado. Adicionar agua peptonada amortiguada en una proporción 1:9 de muestra/caldo (g/mL) para cubrir las piezas. Mezclar bien con agitación e incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.23 Melones. Preferentemente no descongelar las muestras antes del análisis. Si la muestra está congelada atemperar las muestras para obtener la porción analítica. Descongelar en un baño de agua con temperatura controlada con termostato, a $45^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ durante 15 min y con agitación constante, o descongelar manteniendo la muestra a 2°C - 5°C durante 18h. Para la fruta picada o cortada, pesar 25g en condiciones asépticas en un vaso de licuadora. Adicionar 225mL de agua peptonada amortiguada estéril y licuar por 2 min. Pasar el homogeneizado a un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca, de 500mL o cualquier otro recipiente adecuado. Aflojar la tapa e incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.24 Para melones enteros. No enjuagarlos aun si presentan tierra o suciedad visible. Analizarlos como estén. Colocar los melones en una bolsa de plástico estéril. Agregar suficiente agua peptonada amortiguada que permita que el melón flote. El volumen del agua peptonada amortiguada puede ser una y media veces el peso del melón. Por ejemplo los melones pesan 1500g probablemente se necesitará un volumen de aproximadamente 2250mL de agua peptonada amortiguada. Adicionar más agua peptonada amortiguada si es necesario. Colocar la bolsa de plástico con los melones y el agua en un vaso u otro contenedor de tamaño suficiente para sumergir los melones. Doblar el extremo de la bolsa de plástico de forma segura pero no apretada para que permita el paso de aire durante la incubación. Incubar abriendo ligeramente la bolsa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2

A.6.2.25 Mangos. De preferencia, no descongelar las muestras antes de su análisis. Si están congeladas, atemperar las muestras para obtener la porción analítica. Descongelar en un baño de agua con temperatura controlada y termostato, a $45^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ durante 15 min y con agitación constante, o descongelar manteniendo la muestra a 2°C - 5°C durante 18h. Para la fruta picada o cortada, pesar 25g en condiciones asépticas en un vaso de licuadora. Adicionar 225mL de agua peptonada amortiguada estéril y licuar por 2 min. En condiciones asépticas, pasar el homogeneizado a un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca, de 500mL o cualquier otro recipiente de tamaño suficiente para sumergir los mangos. Aflojar la tapa 1/4 de vuelta e incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.26 Para mangos enteros. No enjuagarlos aun si presentan tierra o suciedad visible. Analizarlos como estén. Colocar el mango en una bolsa de plástico estéril. Agregar suficiente agua peptonada amortiguada que permita que el mango flote. El volumen del agua peptonada amortiguada puede ser una vez el peso los mangos. Por ejemplo los mangos pesan 500g, probablemente se necesitará un volumen de aproximadamente 500mL de agua peptonada amortiguada para que floten. Adicionar más agua peptonada amortiguada si es necesario. Colocar la bolsa de plástico con los mangos y el agua peptonada amortiguada en un vaso u otro contenedor de 5L. Incubar abriendo ligeramente la bolsa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2

A.6.2.27 Tomates (tomates rojos o jitomates). Para la fruta picada o cortada, pesar 25g en condiciones asépticas en un vaso de licuadora. Adicionar 225mL de agua peptonada amortiguada estéril y licuar por 2 min. En condiciones asépticas, pasar el homogeneizado a un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca, de 500mL o cualquier otro recipiente de tamaño adecuado para sumergir los tomates. Aflojar la tapa a 1/4 de vuelta e incubar durante $18\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Continuar como se indica en A.7.2.

A.6.2.28 Para tomates enteros. No enjuagarlos aun si presentan tierra o suciedad visible. Analizarlos como estén. Colocar los tomates en una bolsa de plástico estéril. Agregar suficiente agua peptonada amortiguada que permita que los tomates floten. El volumen del agua peptonada amortiguada puede ser una vez el peso de los tomates. Por ejemplo los tomates pesan 300g probablemente se necesitará un volumen de aproximadamente 300mL de agua peptonada amortiguada. Adicionar más agua peptonada amortiguada si es necesario. Colocar la bolsa de plástico con los tomates y el caldo en un vaso u otro contenedor adecuado. Doblar el extremo de la bolsa de plástico de forma segura pero no apretada para que permita el paso de aire durante la incubación. Incubar abriendo ligeramente la bolsa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar como en el punto A.7.2.

A.6.2.29 Muestras ambientales. Muestrear superficies ambientales con hisopos o esponjas estériles. Colocarlos en una bolsa estéril que contenga suficiente caldo Dey-Engley o solución de fosfatos para cubrir los hisopos o esponja. Transportar las muestras protegidas en un contenedor con paquetes de gel congelado para mantener las muestras frías, pero no congeladas. Si las muestras no pueden ser procesadas inmediatamente, refrigerarlas a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Analizar las muestras dentro de las siguientes $48\text{h} \pm 2\text{h}$ después de haber sido muestreadas, agregar a la bolsa o contenedor que contiene los hisopos o esponjas 225mL de agua peptonada amortiguada estéril. Agitar bien el contenido. Cerrar el contenedor, mezclar, por movimientos circulares vigorosos, mantener a temperatura ambiente por $60\text{min} \pm 5\text{min}$. Mezclar con movimientos circulares y medir el pH con papel indicador, cuando sea necesario ajustar el pH a 6.8 ± 0.2 , aflojar la tapa o la boca de la bolsa e incubar durante $18\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.30 Semillas de alfalfa y frijoles. En condiciones asépticas pesar 25g de semillas de alfalfa y frijoles en un matraz Erlenmeyer. Adicionar 225mL de agua peptonada amortiguada agitar el matraz. Cubrir la boca del matraz con papel aluminio estéril. Incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $18\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

A.6.2.31 Agua para consumo humano. Debido a que el agua para consumo humano pasa por procesos de potabilización y purificación, los niveles de microorganismos viables son bajos, por lo que es necesario utilizar métodos de concentración.

A.6.2.31.1 Filtración por membrana. Este método es recomendable para aguas con baja turbiedad. Filtrar 1L o más de la muestra de agua. Retirar la membrana y colocarla en 50mL de agua peptonada amortiguada. Incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar como se describe en el punto A.7.2.

Nota: Para porciones grandes de agua peptonada amortiguada precalentar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ antes de la inoculación de la muestra a analizar.

A.7 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.

A.7.1 Pre-enriquecimiento.

En caso de uso general utilizar como medio de pre-enriquecimiento agua peptonada amortiguada incubar la dilución inicial a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$.

Para moluscos en concha, desconchados y congelados. Inocular a temperatura ambiente 50g del homogenizado (dilución 1:2) a 200mL de agua peptonada amortiguada e incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$.

A.7.2 Enriquecimiento selectivo.

Transferir 0.1mL del cultivo de pre-enriquecimiento a un tubo del 10mL de caldo RVS y 1mL a un tubo conteniendo 10mL de caldo MKTTn.

Incubar el caldo RVS a $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 3\text{h}$ y el caldo MKTTn a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 3\text{h}$.

A.7.3 Aislamiento e identificación.

Para el aislamiento, inocular a partir de los cultivos obtenidos en el punto anterior, 3 medios selectivos en placa como sigue:

Agar XLD para el aislamiento de colonias típicas y ASB para aislamiento de colonias lactosa positivas y cualquier otro medio selectivo sólido complementario. El laboratorio puede seleccionar que medio utilizar. Por ejemplo, se pueden elegir el EH, Agar Verde Brillante, entre otros incluidos agares cromogénicos.

El agar XLD se incuba a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h} \pm 3\text{h}$, el segundo y tercer agar selectivo incubar de acuerdo a las recomendaciones contenidas en los manuales de medios de cultivo de los fabricantes.

A.7.3.1 Morfología Colonial Típica de *Salmonella* spp.

Seleccionar 1 o más colonias de *Salmonella* spp de acuerdo con las características siguientes, en cada agar selectivo:

A.7.3.1.1 XLD. Colonias rosas con o sin centro negro. Muchos cultivos de *Salmonella* spp pueden producir colonias con un centro negro muy grande o completamente negras.

A.7.3.1.2 EH. Colonias azul-verdes o azules, con o sin centro negro. Muchos cultivos de *Salmonella* spp pueden producir colonias con un centro negro muy grande o completamente negras, después de haber sido incubadas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h} \pm 3\text{h}$.

A.7.3.1.3 ASB. Colonias cafés, grises o negras; algunas veces pueden presentar brillo metálico y el medio circundante a la colonia generalmente es café al principio y a medida que se prolonga el tiempo de incubación, pueden aparecer de color negro. Después de haber sido incubadas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h} \pm 3\text{h}$ o hasta 48h.

A.7.3.1.4 Agar VB. Colonias incoloras rosadas o fiusha, transparentes u opacas, sobre el medio coloreado de rosado a rojo, las bacterias fermentadoras de la lactosa dan colonias amarillas.

Si se presentan colonias típicas en ASB después de $24\text{h} \pm 2\text{h}$ de incubación, seleccionar al menos 1 colonia. Si por el contrario, no se observan colonias típicas a las $24\text{h} \pm 2\text{h}$, re-incubar las placas de ASB, otras $24\text{h} \pm 3\text{h}$. Después de $48\text{h} \pm 2\text{h}$ de incubación, seleccionar si están presentes, al menos 1 colonia típica. Si las colonias seleccionadas, no dan reacciones típicas en TSI y LIA, el cultivo se considera como negativo a *Salmonella* spp.

A.7.3.2 Morfología Colonial Atípica de *Salmonella* spp.

En ausencia de colonias típicas sospechosas de *Salmonella* spp, buscar colonias atípicas con las características siguientes:

A.7.3.2.1 Agares EH y XLD. Muy pocos cultivos atípicos de *Salmonella* spp, producen colonias rosa salmón o amarillas respectivamente con o sin centro negro. En ausencia de colonias típicas, en EH y XLD, seleccionar 2 o más colonias atípicas.

Nota: Existen algunas cepas de *Salmonella* spp con un comportamiento bioquímico diferente al resto del género, por ejemplo *S. Paratyphi A* al crecer en XLD genera colonias rosas con el centro más oscuro y no produce H₂S. Otras salmonelas atípicas producen ácido a partir de la lactosa y al crecer en XLD dan colonias amarillas con o sin el centro negro.

A.7.3.2.2 ASB. Algunos cultivos producen colonias verdes con un halo oscuro muy pequeño. Si después de 48h de incubación (como se explicó anteriormente), no hay colonias típicas sospechosas en ASB, seleccionar 2 o más colonias atípicas.

A.7.3.3 Cultivos Control Sugeridos.

Además de los cultivos control positivos (*Salmonella* Typhimurium ATCC14028), deben usarse controles adicionales para ayudar a la selección de colonias atípicas, se recomiendan: *S. diarizonae* (ATCC 12325) lactosa positivo, H₂S positivo y *S. abortus equi* (ATCC 9842), lactosa-negativo, H₂S-negativo; o *S. diarizonae* (ATCC 29934) lactosa-positivo, H₂S-negativo.

A.7.3.4 Selección de colonias para su confirmación.

Para la confirmación, tomar de cada agar selectivo al menos 1 colonia considerada como típica o en total 3 colonias sospechosas si no existe la primera posibilidad.

En casos epidemiológicos, identificar al menos 5 colonias sospechosas, si en una placa se encuentran menos de 5 colonias típicas o sospechosas, confirmar todas las colonias que se encuentren en el medio.

Estriar cada colonia seleccionada en cualquier agar nutritivo, preferiblemente sin agua de condensación, de tal manera que permita el aislamiento de colonias. Incubar las placas inoculadas a 36°C ± 1°C durante 24h ± 3h.

Utilizar cultivos puros para la confirmación por pruebas bioquímicas y serología.

A.7.3.5 Confirmación Bioquímica.

A partir del agar nutritivo, con un asa recta estéril, tocar ligeramente el centro de la colonia seleccionada e inocular en tubos de agar inclinado de TSI y LIA. Sembrar por picadura en el fondo y estría en la superficie inclinada. Debido a que la reacción de descarboxilación de la lisina, es estrictamente anaerobia, el fondo del medio de LIA, debe medir 4cm y el bisel de al menos 2.5cm.

Mantener las placas de agares selectivos y nutritivos entre 2°C-8°C, hasta la conclusión del análisis.

Incubar los tubos de TSI y LIA a 36°C ± 1°C por 24h ± 3h. Dejar los tapones flojos de los tubos para mantener condiciones de aerobiosis mientras se incuban evitando excesiva producción de H₂S. Interpretar los cambios de color como se describe a continuación:

TSI: Fondo del medio;

- Amarillo, glucosa positiva.
- Rojo o sin cambio de color, glucosa negativa.
- Negro, formación de sulfuro de hidrógeno.
- Burbujas o grietas en el medio, formación de gas debido a la utilización de la glucosa.

TSI: Superficie inclinada.

- Amarillo, lactosa y/o sacarosa positivos.
- Rojo o sin cambio de color, lactosa y/o sacarosa negativa.

Las colonias típicas de *Salmonella* spp, producen alcalinidad (color rojo) en la parte inclinada del medio y ácido (color amarillo) en el fondo; con producción de gas y cerca del 90% de los casos producen H₂S (ennegrecimiento del agar). Cuando alguna *Salmonella* spp lactosa positiva es aislada, el agar de TSI se torna completamente amarillo.

En LIA, *Salmonella* spp produce reacción alcalina (color púrpura) considerar como negativos los cultivos que produzcan claramente un color amarillo en el fondo del tubo. La mayoría de los cultivos de *Salmonella* spp producen H₂S en LIA.

Todos los cultivos que den reacción alcalina en el fondo del medio de LIA, independientemente de la reacción que hayan dado en TSI, deben retenerse como aislamientos presuntivos de *Salmonella* spp, para someterlos a pruebas bioquímicas adicionales y pruebas serológicas.

Para los cultivos de TSI que se consideran presuntivos para *Salmonella* spp, continuar como se indica en Identificación de *Salmonella* spp para determinar la especie, incluyendo *Salmonella arizonae*.

a) Prueba de ureasa (convencional).

Con un asa estéril inocular tubos de agar urea de Christensen. Debido a que algunas veces los tubos de agar urea de Christensen sin inocular, pueden virar a rojo púrpura (prueba positiva), debe incluirse, un tubo de este agar sin inocular como control en una prueba negativa. Para *Salmonella* spp no se produce cambio en la coloración (amarillo anaranjado). Incubar 24h ± 2h a 36°C ± 1°C.

b) Caldo L-lisina descarboxilasa.

Si la prueba de LIA fue satisfactoria, no es necesario repetirla. Si la reacción de LIA fue dudosa, utilizar caldo lisina descarboxilasa para la determinación final de lisina descarboxilasa. Inocular el caldo con pequeña cantidad de cultivo. Cerrar la tapa fuertemente e incubar a 36°C ± 1°C por 24h ± 3h. Las especies de *Salmonella* spp dan reacción alcalina por descarboxilación de la lisina (color púrpura del medio). La prueba negativa se interpreta por un color amarillo del medio. Si el medio aparece descolorido (ni púrpura, ni amarillo), agregar unas gotas de colorante púrpura de bromocresol al 0.2% y leer nuevamente la reacción.

c) Detección de β-galactosidasa.

Colocar la colonia seleccionada en un tubo conteniendo 0.25mL de solución salina, agitar para obtener una suspensión homogénea. Adicionar una gota de tolueno y agitar. Colocar el tubo en un baño de agua a 36°C ± 1°C dejar reposar por aproximadamente 5 min. Adicionar 0.25mL del agente de detección de la β-galactosidasa y mezclar. Colocar nuevamente el tubo en el baño de agua a 36°C ± 1°C y dejar por 24h ± 3h. Examinar el tubo a intervalos de tiempo. Un color amarillo es indicativo de reacción positiva, la cual se hace evidente en aproximadamente 20 min. Si se utilizan discos comerciales, seguir las instrucciones del fabricante.

d) Prueba de Indol.

Inocular un tubo conteniendo 5mL del caldo triptona con una suspensión homogénea de la colonia sospechosa.

Incubar a 36°C ± 1°C por 24h ± 3h después de la incubación adicionar de 0.2mL a 0.3 mL de reactivo de Kovac, sin agitar y resbalando por las paredes.

La formación de un anillo de color rojo indica una reacción positiva. Un anillo de color amarillo indica una reacción negativa.

e) Prueba de VP.

Re-suspender una asada de la colonia seleccionada en un tubo estéril conteniendo 3mL del medio VP. Incubar 36°C ± 1°C por 24h ± 3h.

Después de la incubación adicionar dos gotas de solución de creatina, tres gotas de solución á-naftol y al final dos gotas de solución de KOH, agitar después de cada reactivo.

f) Identificación presuntiva del género *Salmonella* spp.

Alternativamente se pueden utilizar pruebas bioquímicas miniaturizadas o métodos de biología molecular disponibles en el mercado para la identificación presuntiva de género *Salmonella* spp, se deberá utilizar un sistema adecuado basado en el sistema bioquímico descrito en esta sección. Estos sistemas bioquímicos deberán contar con validación y no deben ser usados como sustitutos de las pruebas serológicas. Inocular e incubar estos sistemas de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

A.7.3.5.1 Interpretación de las pruebas bioquímicas.**Tabla A.1 Interpretación de pruebas bioquímicas.**

Pruebas ^a	Cepas de <i>Salmonella</i>									
	<i>S. typhi</i>		<i>S. Paratyphi A</i>		<i>S. Paratyphi B</i>		<i>S. Paratyphi C</i>		Otras cepas	
	Reacción	% ^b	Reacción	% ^b	Reacción	% ^c	Reacción	% ^c	Reacción	% ^b
TSI producción de ácido de la glucosa	+	100	+	100	+		+		+	100
TSI formación de gas de la glucosa	- ^d	0	+	100	+		+		+	92
TSI producción de ácido de la lactosa	-	2	-	100	-		-		-	1
TSI producción de ácido de sucrosa	-	0	-	0	-		-		-	1
TSI producción de sulfuro de hidrogeno	+	97	-	10	+		+		+	92
Hidrólisis de urea	-	0	-	0	-		-		-	1
Descarboxilación de la lisina	-	98	-	0	+		+		+	95
Reacción de β-galactosidasa	-	0	-	0	-		-		-	2 ^e
Reacción Voges-Proskauer	-	0	-	0	-		-		-	0
Producción de indol	-	0	-	0	-		-		-	1
^a Ewing, W.h. y Ball, M. M. The biochemical reactions of the genus <i>Salmonella</i> . National Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA, 1996. ^b este porcentaje indica que no todas las cepas de <i>Salmonella</i> muestran la reacción indicada puede ser más o menos. Estos porcentajes pueden variar dependiendo de los serotipos de intoxicación alimentaria y su lugar de procedencia. ^c los porcentajes no han sido encontrados en la literatura. ^d <i>Salmonella Typhi</i> es anaerobio. ^e La <i>Salmonella</i> entérica subespecie <i>Arizonae</i> puede ser positiva o negativa a la lactosa pero siempre será β-galactosidasa positiva.										

S. diarizonae (ATCC 12325) lactosa positivos, H₂S positivo y *S. abortus equi* (ATCC 9842), lactosa-negativo, H₂S-negativo; o *S. diarizonae* (ATCC 29934) lactosa-positivo, H₂S-negativo.

A.7.3.5.2 Pruebas Serológicas.**A.7.3.5.3 General.**

La aglutinación con el antisuero polivalente Poly A-I & Vi, puede usarse como resultado confirmatorio de la presencia de *Salmonella* spp para las cepas probadas por TSI y LIA, existen cepas que no aglutinan con el polivalente, pero que dan reacciones típicas en TSI y LIA, para éstas es necesario confirmar usando la batería completa de bioquímicas.

A.7.3.5.4 Eliminación de las cepas autoaglutinables.

Deposite una gota de solución salina, en un portaobjetos perfectamente limpio. Disperse con un asa, parte de la colonia a probar en la gota, de manera que se obtenga una suspensión homogénea y turbia. Rote suavemente la lámina por 30s a 60s. Observe el resultado sobre un fondo oscuro, preferiblemente con la ayuda de una lupa. Si las bacterias se agrupan en grumos de diferentes tamaños, la cepa se considera como autoaglutinable deberán identificarse por pruebas bioquímicas complementarias y no someterse a la serotipificación.

NOTA: También es posible dispersar parte de la colonia a analizar en una gota de agua y luego mezclar esta solución con una gota de la solución salina.

A.7.3.5.5 Detección de los antígenos Poly A-I & Vi.

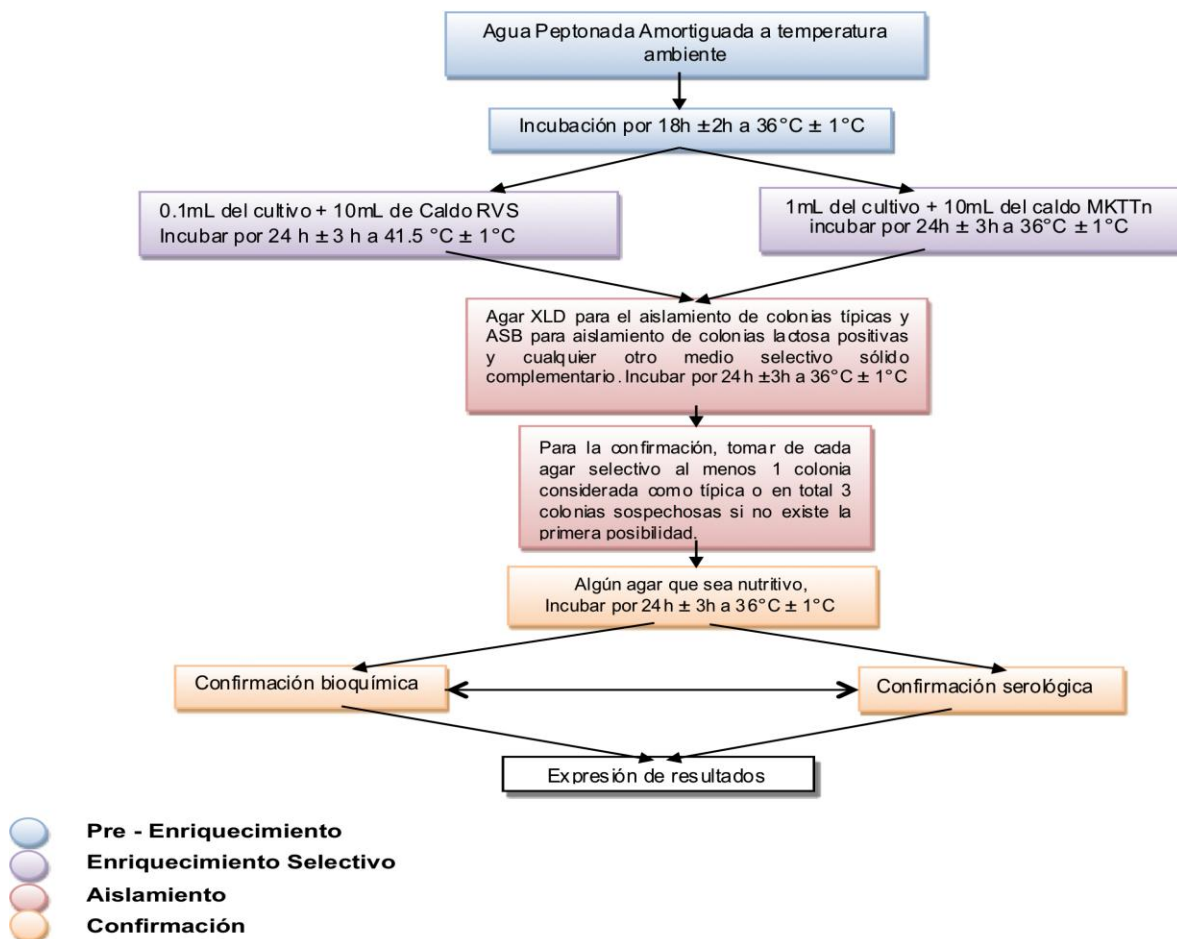
Empleando una colonia pura no autoaglutinable, proceda, empleando una gota de la solución salina en una lámina de vidrio, disperse con el asa hasta obtener una suspensión homogénea y agregue una gota del antisero O. Si se produce aglutinación, la reacción se considera positiva del antisero O en lugar de la solución salina. Si se produce aglutinación, la reacción se considera positiva.

Para fines de vigilancia sanitaria, enviar el cultivo al laboratorio de referencia CCAyAC de la COFEPRIS para su identificación serológica o molecular.

A.8 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

a) Los cultivos determinados como presuntivos con las pruebas bioquímicas y confirmados por la serología, informar como:

Salmonella spp en 25g: PRESENCIA.



b) Descartar los cultivos con resultados atípicos a partir de las pruebas bioquímicas miniaturizadas clasificadas como no *Salmonella* spp, informar:

Salmonella spp en 25g: AUSENCIA.

c) Placas con agar XLD, ASB y el tercer medio selectivo sin desarrollo y/o colonias atípicas, informar:

Salmonella spp en 25g: AUSENCIA.

d) En caso de que la cantidad sea menor a 25g se debe reportar la presencia o ausencia de *Salmonella* spp en la porción de ensayo (g o mL) de producto utilizado.

e) Para los casos en los que se analiza una pieza de producto reportar como presencia o ausencia por piezas analizadas.

A.9 AYUDA VISUAL.**A.10 FORMULACIONES Y PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.**

Alternativamente pueden utilizarse medios comerciales con excepción del medio RVS ya que en punto A.10.2.1.2 se indica que debe prepararse por ingredientes

La caducidad de los medios de cultivo una vez preparado deberá ser demostrada en el laboratorio bajo las condiciones de almacenamiento particulares con excepción del medio RVS y que en el punto **A.10.2.4.2 indica que debe ser usado el día de su preparación, el Caldo MKTTn para el que se indica en el punto A.10.3.4.2 que el medio deben usarse el mismo día de su preparación, el medio XLS para el que se indica que no debe usarse por más de 5 días.**

A.10.1 Agua peptonada amortiguada.**A.10.1.1 Fórmula.**

Digerido enzimático de caseína	10.0g
NaCl	5.0g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	9.0g
KH ₂ PO ₄	1.5g
Agua	1 000mL

A.10.1.2 Preparación: Disolver los ingredientes en el agua, calentar si es necesario. Ajustar el pH, de tal manera que después de la esterilización sea 7.0 ± 0.2 a 25°C. Distribuir el medio en frascos de capacidad necesaria para obtener las porciones de prueba. Esterilizar en autoclave 15 min a 121°C.

A.10.2 Caldo RVS.**A.10.2.1 Solución A.****A.10.2.1.1 Fórmula.**

Digerido enzimático de soya	5.0g
NaCl	8.0g
KH ₂ PO ₄	1.4g
K ₂ HPO ₄	0.2g
Agua	1000mL

A.10.2.1.2 Preparación: Preparar por ingredientes y disolverlos en el agua, es necesario calentar aproximadamente a 70°C. La solución debe prepararse el día de la preparación del medio de RVS completo.

A.10.2.2 Solución B.**A.10.2.2.1 Fórmula.**

MgCl ₂ .6H ₂ O	400.0g
Agua	1000mL

A.10.2.2.2 Preparación: Disolver el cloruro de magnesio en el agua. Como esta sal es muy higroscópica, es aconsejable disolver el contenido completo de un frasco nuevo de MgCl₂.6H₂O de acuerdo a la fórmula. Por ejemplo, agregando 250g de MgCl₂.6H₂O a 625mL de agua, dará un volumen total de solución de 788mL y una concentración de 31.7g por cada 100mL de MgCl₂.6H₂ aproximadamente.

La solución puede almacenarse en un frasco ámbar con tapa hermética a temperatura ambiente por 2 años.

A.10.2.3 Solución C.**A.10.2.3.1 Fórmula.**

Oxalato de verde malaquita	0.4g
Agua	100mL

A.10.2.3.2 Preparación: Disolver el oxalato de verde malaquita en el agua. La solución puede almacenarse en frasco ámbar a temperatura ambiente por 8 meses.

A.10.2.4 Medio Completo.

A.10.2.4.1 Fórmula.

Solución A	1000mL
Solución B	100mL
Solución C	10mL

A.10.2.4.2 Preparación: Agregar 1000mL de la solución A, 100mL de la solución B y 10mL de la solución C. Ajustar el pH, si es necesario, de tal manera que después de la esterilización sea de 5.2 ± 0.2 . Antes de su uso, distribuir porciones de 10mL a cada tubo. Esterilizar a 115°C por 15 min. Almacenar el medio preparado a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, utilizar el medio el mismo día de su preparación.

Nota: La composición final del medio completo será de: Digerido enzimático de soya, 4.5g/L; NaCl, 7.2g/L; $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$, 1.44g/L; MgCl_2 , 13.4g/L o $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 28.6g/L; oxalato de verde malaquita, 0.036g/L.

A.10.3 Caldo MKTTn.

A.10.3.1 Medio Base.

A.10.3.1.1 Fórmula.

Extracto de carne	4.3g
Digerido enzimático de caseína	8.6g
NaCl	2.6g
CaCO_3	38.7g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	47.8g
Ox sales biliares uso bacteriológico	4.78g
Verde brillante	0.0096g
Agua	1000mL

A.10.3.1.2 Preparación: Disolver los ingredientes deshidratados básicos de la fórmula o el medio completo deshidratado en el agua, hervir por 5 min. Ajustar el pH, si es necesario, a 8.2 ± 0.2 a 25°C . El medio base puede almacenarse por 4 semanas a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

A.10.3.2 Solución de Yodo–Yoduro

A.10.3.2.1 Fórmula.

Yodo	20.0g
Yoduro de potasio (KI)	25.0g
Agua	100mL

A.10.3.2.2 Preparación: Disolver completamente el yoduro de potasio en 10mL de agua, agregar el yodo y diluir a 100mL con agua estéril. No calentar.

Almacenar la solución en la oscuridad a temperatura ambiente en un frasco bien cerrado.

A.10.3.3 Solución de Novobiocina.

A.10.3.3.1 Fórmula.

Novobiocina (sal sódica)	0.04g
Agua	5.0mL

A.10.3.3.2 Preparación: Disolver la novobiocina (sal sódica) en el agua y esterilizar por filtración. Puede almacenar la solución por no más de 4 semanas a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

A.10.3.4 Medio Completo.

A.10.3.4.1. Fórmula.

Medio base	1000mL
Solución de yodo-yoduro	20mL
Solución de novobiocina	5mL

A.10.3.4.2. Preparación: Agregar asépticamente 5mL de solución de novobiocina a 1000mL de medio base. Mezclar, después agregar 20mL de la solución de yodo-yoduro. Mezclar bien. Distribuir el medio asépticamente en recipientes estériles de suficiente capacidad para contener las porciones necesarias de prueba. El medio completo deberá utilizarse el mismo día de la preparación.

A.10.4 Agar XLD.

A.10.4.1 Medio Base.

A.10.4.1.1 Fórmula.

Extracto de levadura en polvo	3.0g
NaCl	5.0g
Xilosa	3.5g a 3.75g
Lactosa	7.5g
Sacarosa	7.5g
L-Lisina	5.0g
Tiosulfato de sodio	6.8g
Citrato férrico amónico	0.8g
Rojo de fenol	0.08g
Desoxicolato de sodio	1.0g a 2.5g
Agar	9.0g a 18.0g
Agua	1000mL

A.10.4.1.2 Preparación: Disolver los ingredientes básicos deshidratados de la fórmula o el medio completo deshidratado en el agua por calentamiento, con agitación frecuente, hasta que el medio comience a hervir. Evitar el sobrecalentamiento. Ajustar el pH, si es necesario, a 7.4 ± 0.2 a 25°C .

A.10.4.1.3 Preparación de las placas de agar: Transferir el medio inmediatamente a un baño de agua a $44^{\circ}\text{C} - 47^{\circ}\text{C}$ y esperar a que el medio se atempere, agitar y vaciar en las placas, dejar solidificar. Antes de su uso las placas deberán estar completamente secas, se recomienda secar las placas en horno entre 37°C y 55°C con las tapas parcialmente abiertas o en campana de flujo laminar hasta que la superficie del agar este seca. El medio se puede almacenar por no más de 5 días a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

A.10.5 Agar nutritivo.

A.10.5.1 Fórmula.

Extracto de carne	3.0g
Peptona	5.0g
Agar	15.0g
Agua	1000mL

A.10.5.2 Preparación: Disolver los ingredientes o el medio completo deshidratado en el agua, por calentamiento. Si es necesario, ajustar el pH de tal manera que después de la esterilización quede en 6.8 ± 0.2 a 25°C . Transferir el medio de cultivo a tubos o botellas de capacidad apropiada. Esterilizar por 15 min a 121°C .

A.10.5.2.1 Preparación de las placas de agar nutritivo: Transferir el medio inmediatamente a un baño de agua a 44°C – 47°C y esperar a que el medio se atempere, agitar y vaciar 15mL del medio fundido a placas estériles, dejar solidificar. Las superficies de las placas deben estar completamente secas antes de su uso, se recomienda secar las placas en un horno entre 37°C y 55°C con las tapas parcialmente abiertas o en campana de flujo laminar hasta que la superficie del agar este seca.

A.10.6 Agar TSI.

A.10.6.1 Fórmula.

Extracto de carne	3.0g
Extracto de levadura	3.0g
Peptona	15.0g a 20.0g
NaCl	5.0g
Lactosa	10.0g
Sacarosa	10.0g
Glucosa	1.0g
Citrato de hierro (III)	0.2g a 0.3g
Tiosulfato de sodio	0.3g
Rojo de fenol	0.024g
Agar	12.0g a 15.0g
Agua	1000mL

A.10.6.2 Preparación: Disolver los ingredientes o el medio completo deshidratado en el agua por calentamiento. Si es necesario, ajustar el pH de tal manera que después de la esterilización quede en 7.4 ± 0.2 a 25°C. Distribuir 10mL del medio en tubos de ensaye. Esterilizar por 15 min a 121°C. Dejar solidificar en posición inclinada para obtener un fondo de 4cm y un bisel de al menos 2.5cm.

A.10.7 Agar Urea de Christensen.

A.10.7.1 Medio Base.

A.10.7.1.1 Fórmula.

Peptona	1.0g
Glucosa	1.0g
NaCl	5.0g
Fosfato dihidrogenado de potasio (KH_2PO_4)	2.0g
Rojo de fenol	0.012g
Agar	15.0g
Agua	1000mL

A.10.7.1.2 Preparación: Disolver los ingredientes o el medio completo deshidratado por calentamiento. Si es necesario, ajustar el pH de tal manera que después de la esterilización quede en 6.8 ± 0.2 a 25°C. Esterilizar por 15 min a 121°C.

A.10.7.2 Solución de urea.

A.10.7.2.1 Fórmula.

Urea	400g
Agua, para un volumen final de	1000mL

A.10.7.2.2 Preparación: Disolver la urea en el agua. Esterilizar por filtración.**A.10.7.3 Medio Completo.****A.10.7.3.1 Fórmula.**

Medio base	950mL
Solución de Urea	50mL

A.10.7.3.2 Preparación: Agregar bajo condiciones asépticas, la solución de urea al medio base, previamente fundido y mantenido de 44°C – 47°C en el baño de agua. Distribuir 10mL del medio completo a tubos de ensaye.

A.10.8 Reactivo de β -Galactosidasa.**A.10.8.1 Solución amortiguadora.****A.10.8.1.1 Fórmula.**

NaH ₂ PO ₄	6.9g
NaOH, 10mol/L solución	$\simeq$ 3mL
Agua, para un volumen final de	50mL

A.10.8.1.2 Preparación: Disolver el fosfato dihidrogenado de sodio en $\simeq$ 45mL de agua en un matraz volumétrico. Ajustar el pH a 7.0 ± 0.2 a 25°C con la solución de hidróxido de sodio. Agregar agua para un volumen final de 50mL.

A.10.8.2 Solución de ONPG.**A.10.8.2.1 Fórmula.**

ONPG	0.08g
Agua	15mL

A.10.8.2.2 Preparación: Disolver el ONPG en el agua a aproximadamente 50°C. Enfriar la solución.

A.10.8.3 Reactivo Completo.**A.10.8.3.1 Fórmula.**

Solución amortiguadora	5mL
Solución de ONPG	15mL

A.10.8.3.2 Preparación: Agregar la solución amortiguadora a la solución de ONPG.

A.10.9 Reactivos para la prueba VP.**A.10.9.1 Medio de RM-VP.****A.10.9.1.1. Fórmula.**

Peptona	7.0g
Glucosa	5.0g
K ₂ HPO ₄	5.0g
Agua	1000mL

A.10.9.1.2 Preparación: Disolver los ingredientes en agua, calentar si es necesario. Ajustar el pH de tal forma que después de la esterilización quede a 6.9 ± 0.2 a 25°C. Transferir 3mL de volumen a tubos de ensaye y esterilizar por 15 min a 121°C.

A.10.9.2 Solución de creatina (N-amidinosarcosina).**A.10.9.2.1 Fórmula.**

Monohidrato de creatina	0.5g
Agua	100mL

A.10.9.2.2 Preparación: Disolver el monohidrato de creatina en el agua.**A.10.9.3 α -naftol, solución etanólica****A.10.9.3.1 Fórmula**

α -Naftol	6g
Etanol al 96%	100mL

A.10.9.3.2 Preparación: Disolver el 1-naftol en el etanol.**A.10.9.4 Solución de KOH.****A.10.9.4.1 Fórmula.**

KOH	40g
Agua	100mL

A.10.9.4.2 Preparación: Disolver el KOH en el agua.**A.10.10 Reactivos para la reacción de Indol.****A.10.10.1 Caldo triptona al 1%.****A.10.10.1.1 Fórmula.**

Triptona o tripticasa	10g
Agua destilada	1000mL

pH final: 6,9 $\pm$ 0,2

A.10.10.1.2 Preparación: Disolver los ingredientes, distribuir en porciones de 5mL en tubos de ensaye de 16mm x 125mm o 16mm x 150mm y esterilizar a 121°C por 15 min.

A.10.11 Reactivo de Kovac.**A.10.11.1 Fórmula.**

4-Dimetilaminobenzaldehído	5g
Ácido hidroclicóric, $\rho = 1.18 \text{ g/mL}$ a 1.19 g/mL	25mL
2-metilbutan-2-ol	75mL

A.10.11.2 Preparación: Mezclar los componentes.**A.10.12 Solución Salina Fisiológica.****A.10.12.1 Fórmula.**

NaCl	8.5g
Agua	1000mL

A.10.12.2 Preparación: Disolver el cloruro de sodio en el agua. Si es necesario, ajustar el pH de tal manera que después de la esterilización quede en 7.0 ± 0.2 a 25°C. Distribuir volúmenes de la solución de tal manera que después de la esterilización queden entre 90mL a 100mL. Esterilizar 15 min a 121°C.

A.10.13 Agar EH.**A.10.13.1 Fórmula.**

Peptona	12g a 15g
Extracto de levadura	3g
Sales biliares No. 3	9g
Lactosa	12g
Sacarosa	12g
Salicina	2g
NaCl	5g
Tiosulfato de sodio	5g
Citrato férrico amónico	1.5g
Azul de bromotimol	0.064g a 0.065g
Fucsina ácida	0.1g
Agar	14.0g
Agua destilada	1L
pH final 7.5 ± 0.2	

A.10.13.2 Preparación: Calentar a ebullición con agitación frecuente para disolver los ingredientes por no más de 1 min. No sobrecalear. Enfriar a 45°C-50°C. Distribuir en porciones de 20mL en cajas Petri de 15mm x 100mm. Dejar secar por 2h con las tapas parcialmente abiertas. Almacenar hasta 30 días en refrigeración (4°C ± 2°C).

A.10.14 Agar ASB.**A.10.14.1 Fórmula.**

Polipeptona (o peptona)	10g
Extracto de carne	5g
Dextrosa	5g
Na ₂ HPO ₄ (anhidro)	4g
FeSO ₄ (anhidro)	0.3g
Sulfito de bismuto (indicador)	8g
Verde brillante	0.025g
Agar	15g a 20g
Agua destilada	1L
pH, 7.7 ± 0.2	

A.10.14.2 Preparación: Mezclar los ingredientes con calentamiento y agitación constante a ebullición por 1 min hasta obtener una suspensión uniforme (el precipitado no se disuelve). Enfriar a 45°C-50°C. Suspender el precipitado con agitación suave y distribuir volúmenes de 20mL en cajas Petri estériles de 15mm x 100mm. Permitir que seque el agar por 2h con las tapas parcialmente abiertas y después cerrarlas.

PRECAUCIÓN: No esterilizar. Preparar el medio un día antes de su uso y almacenar en oscuridad. El medio pierde selectividad después de 48h.

A.10.15 Caldo L-lisina descarboxilasa.**A.10.15.1 Fórmula.**

Monoclorhidrato de L-lisina	5.0g
Extracto de levadura	3.0g
Glucosa	1.0g
Púrpura de bromocresol	0.015g a 0.02g
Peptona	5.0g
Agua	1000 mL

A.10.15.2 Preparación: Disolver los componentes en el agua, con el calentamiento necesario. Ajustar el pH si es necesario y después de la esterilización debe ser 6.8 ± 0.2 a 25°C . Transferir el medio en cantidades de 2mL a 5mL y esterilizar en autoclave por 15 min a 121°C .

A.10.16 Agar de hierro y lisina (LIA).

A.10.16.1 Fórmula.

Peptona de gelatina	5.0g
Extracto de levadura	3.0g
Glucosa	1.0g
L-lisina	10.0g
Citrato férrico-amónico	0.5g
Tiosulfato de sodio anhidro	0.04 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agar	13.0g a 15.0g
Agua destilada	100mL
pH, 6.7 ± 0.2	

A.10.16.2 Preparación: Suspender los ingredientes en el agua destilada y mezclar bien, calentar hasta ebullición con agitación frecuente hasta conseguir la disolución completa. Ajustar el pH.

Distribuir en volúmenes de 3mL en tubos de 13mm x 100mm, con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 12 min. Dejar que los tubos se enfríen en posición inclinada, de tal modo que se obtengan columnas de medio de 4cm y una superficie inclinada de 2cm. En el punto A.7.3.5 donde se hace mención que el bisel deberá tener una longitud de al menos 2.5cm. El medio ya preparado es de color púrpura.

Apéndice B Normativo.

Método de referencia para la estimación de la cuenta de *S. aureus*.

Se establece el método microbiológico para determinar la cuenta de *S. aureus* presente en alimentos para consumo humano nacionales o de importación.

B.1 INTRODUCCIÓN.

S. aureus es una bacteria altamente vulnerable a tratamientos térmicos y a varios agentes sanitizantes. La presencia de esta bacteria en los alimentos procesados o en los equipos donde se procesan, es generalmente un indicador de sanitización inadecuada o manejo inadecuado durante la producción. *S. aureus* produce enterotoxinas termorresistentes que al ingerirse pueden causar intoxicaciones alimentarias. Es actualmente responsable de un alto porcentaje de los brotes de intoxicación alimentaria a nivel mundial.

Para el propósito del presente método, la confirmación de *S. aureus* está basada en una fuerte reacción de coagulasa, pero se reconoce que hay algunas cepas de *S. aureus* que producen una reacción débil. Estas últimas cepas se pueden confundir con otras bacterias, por lo cual es de igual importancia someter a la par la prueba de termonucleasa y por medio del uso de pruebas adicionales, como son la producción de ácido a partir del manitol, entre otras.

Este método permite hacer una estimación del contenido de *S. aureus* en los productos de consumo, se efectúa directamente en placas de medio de cultivo selectivo y diferencial, con la confirmación mediante las pruebas de coagulasa/termonucleasa como determinante y pruebas auxiliares.

B.2 EQUIPO.

B.2.1 Horno para esterilizar que alcance 180°C ;

B.2.2 Autoclave;

B.2.3 Balanza granataria;

B.2.4 Incubadora capaz de operar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;

B.2.5 Homogeneizador peristáltico tipo Stomacher o licuadora, y

B.2.6 Baño de agua capaz de operar a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

B.3 MATERIALES.

B.3.1 Cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas;

B.3.2 Tubos de cultivo de 16mm x 150mm o frascos de 125mL a 250mL de capacidad;

B.3.3 Tubos de cultivo de 10mm x 75mm;

B.3.4 Cajas Petri de 90mm a 100mm de diámetro;

B.3.5 Pipetas de 1mL y 10mL de capacidad graduada en 0.1mL y 1mL respectivamente y diámetro de 2mm a 3mm;

B.3.6 Pipetas Pasteur;

B.3.7 Probetas;

B.3.8 Varillas de vidrio de 3.5mm de diámetro aproximadamente y 20cm de largo dobladas en ángulo recto u equivalente;

B.3.9 Matraz Erlenmeyer, y

B.3.10 Cámara húmeda: consiste en una caja Petri en la cual se coloca una varilla de vidrio en forma de "V" rodeada de algodón humedecido con agua.

B.4 MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.

B.4.1 Agar Baird Parker;

B.4.2 Solución de telurito de potasio;

B.4.3 Emulsión de yema de huevo (puede usarse comercialmente preparada);

B.4.4 BHI;

B.4.5 Solución reguladora de fosfatos;

B.4.6 Agua peptonada;

B.4.7 Solución Salina 0.85%;

B.4.8 Agar Azul de Toluidina-ADN;

B.4.9 Plasma de Conejo con EDTA;

B.4.10 Agua peptonada amortiguada;

B.4.11 Peróxido de hidrógeno al 3%;

B.4.12 Reactivos para la tinción de Gram;

B.4.13 Caldo rojo de fenol (glucosa y manitol);

B.4.14 Aceite de parafina o mineral estéril;

B.4.15 *S. aureus* ATCC 6538, 25923;

B.4.16 *S. epidermidis* ATCC 12228, y

B.4.17 Solución trazable para verificación de potenciómetro.

B.5. CONDICIONES DE PRUEBA.

B.5.1 Preparación de la muestra.

Tomar diferentes porciones del alimento, transferir 25g o mL a frascos de dilución con 225mL de solución reguladora de fosfatos, fosfatos o agua peptonada amortiguada, para preparar una dilución 1:10.

Cuando no se disponga de 25g de muestra se deberá justificar y utilizar la cantidad necesaria de solución reguladora de fosfatos, para obtener una dilución 1:10.

Homogeneizar por 1 min o 2 min en licuadora u homogeneizador peristáltico.

B.5.2 Preparación de la muestra para Moluscos en concha.

Preparar como se indica en el punto A.6.2.4.

B.5.3 Procedimiento para Moluscos, desconchados y congelados.

Preparar como se indica en el punto A.6.2.5.

B.5.4 Productos de la pesca.

Pesar 200g del alimento en 200mL de regulador de fosfatos o agua peptonada amortiguada (dilución 1:2) y homogeneizar por 2 min en vaso de licuadora u homogeneizador peristáltico, el volumen total en el vaso debe cubrir totalmente las aspas. Las muestras congeladas deben descongelarse en refrigeración (2°C-5°C) un máximo de 18h antes de su análisis.

B.6 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.

B.6.1 Transferir por medio de una pipeta estéril, 0.1mL de la muestra directa si es líquida, o 0.1mL de la suspensión inicial (dilución 10^{-1}) en el caso de otros productos, por duplicado a cajas de agar Baird Parker. Repetir el procedimiento para las diluciones siguientes si son necesarias 10^{-2} , 10^{-3} .

Nota: Si se sospecha que el alimento contiene bajas cuentas de *S. aureus*, se deberá aumentar el límite de detección, en un factor igual a 10 inoculando 1mL de la muestra directa si ésta es líquida, o de cada dilución distribuida en 3 placas como sigue: 0.4mL, 0.3mL y 0.3mL sobre la superficie de las placas de agar Baird-Parker, por duplicado. En ambos casos evitar usar cajas húmedas.

B.6.2 Cuidadosamente distribuir el inóculo tan pronto como sea posible, sobre la superficie del agar con varillas estériles de vidrio en ángulo recto, utilizando una para cada placa y dilución.

B.6.3 Mantener las placas con las tapas hacia arriba hasta que el inóculo sea absorbido totalmente por el agar.

B.6.4. Invertir las placas e incubar por 44h a 48h a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, buscar colonias con morfología colonial típica: colonias negras, circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1mm a 2mm y muestran una zona opaca, húmedas y con un halo claro (debido a la actividad de la lecitinasa) alrededor de la colonia.

NOTA: En algunas ocasiones cepas que han sido aisladas de productos congelados o deshidratados que han sido almacenados por periodos largos de tiempo, frecuentemente desarrollan colonias menos negras con apariencia rugosa y textura seca. Las colonias atípicas son similares en apariencia pero sin halo claro alrededor.

B.6.5 Seleccionar las placas que tengan entre 15 y 150 colonias típicas y atípicas de *S. aureus*; si no es posible, seleccionar las placas de las diluciones más altas no obstante tengan más de 150 colonias. Seleccionar por muestra 5 colonias típicas para su confirmación o 5 colonias atípicas, para la realización de la tinción de Gram, en el caso de observar bacilos positivos, la colonia se tomará como negativa para *S. aureus*, por lo contrario si se observan cocos se seguirá con su confirmación.

B.6.6 Cuando las placas tengan menos de 15 colonias típicas se debe agregar la nota de "valor estimado" al reporte de los resultados.

B.6.7 Si fue inoculado 1.0mL en 3 placas, tratar éstas como una sola y seguir los procedimientos de confirmación.

B.6.8 Confirmación.

B.6.8.1 Prueba de coagulasa. Seleccionar y sembrar cada colonia típica en tubos con 0.5mL de BHI y en tubos con AST. Utilizar simultáneamente un control positivo de *S. aureus* y un control negativo de *S. epidermidis*. Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en baño de agua, durante 20h a 24h. Mantener los cultivos en AST a no más de $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para pruebas posteriores. Agregar a 0.1mL del cultivo anterior a 0.3mL de plasma de conejo con EDTA (a menos que el fabricante indique otras cantidades). Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en baño de agua y observar periódicamente a intervalos de 1h durante las primeras 4h a 6h; si no hay formación de coágulo, observar hasta las 24h. Considerar la prueba positiva cuando el coágulo se forma completamente y es firme al invertir el tubo. En otro caso se deberán realizar las pruebas auxiliares, descritas en el punto B.6.9.

B.6.8.2 Para cada lote nuevo de reactivo se deberá realizar la prueba de coagulabilidad del plasma de conejo añadiendo una gota de cloruro de calcio al 5% a 0.5mL de plasma reconstituido, formándose un coágulo en 10s-15s.

B.6.8.3 Prueba de termonucleasa. Preparar portaobjetos con 3mL de agar azul de toluidina-ADN. Con ayuda de una pipeta Pasteur hacer orificios equidistantes en el agar. En un baño de agua hirviendo calentar durante 15 min, 0.3mL de cultivo en BHI. Utilizando una pipeta Pasteur transferir una gota del cultivo a un orificio del medio, repetir para cada cepa incluyendo testigos positivo y negativo. Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en cámara húmeda de 4h a 24h. La aparición de un halo color rosa extendido de por lo menos 1mm alrededor de la perforación califica como positiva la prueba.

B.6.9 Pruebas auxiliares.

B.6.9.1 Realizar una tinción de Gram a cada cultivo y observar al microscopio la presencia de cocos Gram positivos, agrupados en racimos.

B.6.9.2. Si se dispone de un sistema de bioquímicas miniaturizado, éste puede ser utilizado como alternativa de las siguientes pruebas bioquímicas, con excepción de la tinción de Gram, coagulasa y termonucleasa:

B.6.9.2.1 Prueba de catalasa. A partir de un cultivo en AST realizar la prueba de la catalasa en un portaobjetos, emulsificar una porción del cultivo con una gota de peróxido de hidrógeno al 3%. Observar la producción de burbujas de gas.

B.6.9.2.2 Utilización anaeróbica del manitol. Inocular un tubo con caldo para la fermentación adicionado de manitol al (0.5%), con un inóculo abundante. Cubrir el caldo con una capa de aceite de parafina o aceite mineral de al menos 25mm. Incubar hasta 5 días a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Un cambio en la coloración del indicador indica la utilización anaeróbica del manitol y la presencia *S. aureus*. Incluir los controles positivos y negativos.

B.6.9.2.3 Utilización anaeróbica de la glucosa. Inocular un tubo con caldo para la fermentación adicionado de glucosa al (0.5%), con un inóculo abundante. Cubrir el caldo con una capa de aceite de parafina o aceite mineral de al menos 25mm. Incubar hasta 5 días a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Un cambio en la coloración del indicador indica la utilización anaeróbica de la glucosa y la presencia *S. aureus*. Incluir los controles positivos y negativos.

Tabla B.1. Características de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *Micrococcus*.

Características	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Micrococcus</i>
Actividad de catalasa	+	+	+
Producción de coagulasa	+	-	-
Producción de termonucleasa	+	-	-
Utilización anaeróbica de: Glucosa	+	+	-
Utilización anaeróbica de: Manitol	+	-	-

+, La mayoría de las cepas son positivas (más del 90%).

-, La mayoría de las cepas son negativas (más del 90%).

B.7 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

B.7.1 Las pruebas de termonucleasa o coagulasa positiva son consideradas como resultados confirmatorios de *S. aureus*.

B.7.2 Si al menos el 80% de las colonias típicas seleccionadas fueron coagulasa positiva y/o termonucleasa positiva tomar el número total de las colonias contadas como presuntivas de *S. aureus*.

B.7.3 En otros casos, calcular el número de colonias presuntivas de *S. aureus* a partir del porcentaje obtenido de colonias coagulasa y/o termonucleasa positivas confirmadas.

B.7.4 Promediar los resultados de los duplicados.

B.7.5 Cuando en dos diluciones consecutivas se obtienen cuentas entre 15 y 150 colonias (típicas o atípicas) calcular el número de *S. aureus* para cada dilución como se especifica en los puntos anteriores, calcular la cuenta de *S. aureus* considerando el factor de dilución, calcular el logaritmo en base diez de cada dilución y realizar la resta de éstos, si la diferencia entre los logaritmos de las dos diluciones es menor a 0.3, reportar el promedio de las dos diluciones. Si por el contrario la diferencia entre los logaritmos es mayor a 0.3; reportar el valor más bajo.

B.7.6 Cuando no se tenga crecimiento reportar como:

DILUCIÓN DE LA MUESTRA	VOLUMEN INOCULADO	RESULTADO
MUESTRA DIRECTA	1mL (0.4mL, 0.3mL Y 0.3 mL)	< 1 UFC/mL
MUESTRA DIRECTA	0.1 mL	< 10 UFC/mL
10^{-1}	1mL (0.4, 0.3 Y 0.3 mL)	< 10 UFC/mL
10^{-1}	0.1mL	< 100 UFC/mL

B.7.7 Ejemplo para el cálculo de *S. aureus*.

Por ejemplo, el 0.1mL del inóculo de la dilución 10^{-2} de la muestra da como resultado 65 y 85 colonias típicas por placa.

Ninguna colonia atípica fue identificada en las placas.

Todas las 5 colonias seleccionadas de la placa conteniendo 65 colonias fueron coagulasa y termonucleasa positiva por lo que las 65 colonias fueron consideradas como *S. aureus*.

3 de las 5 colonias seleccionadas de la placa que contiene 85 colonias fueron coagulasa y termonucleasa positiva por lo que el 60%, es decir, 51 colonias son consideradas como *S. aureus*.

La cuenta promedio tomando en cuenta solo las positivas es:

$65 + 51/2 = 58$ *S. aureus*. Redondeando a dos cifras significativas ≈ 60

58 por el inverso del factor de dilución ($1/10^{-2}$) es 5800 UFC.

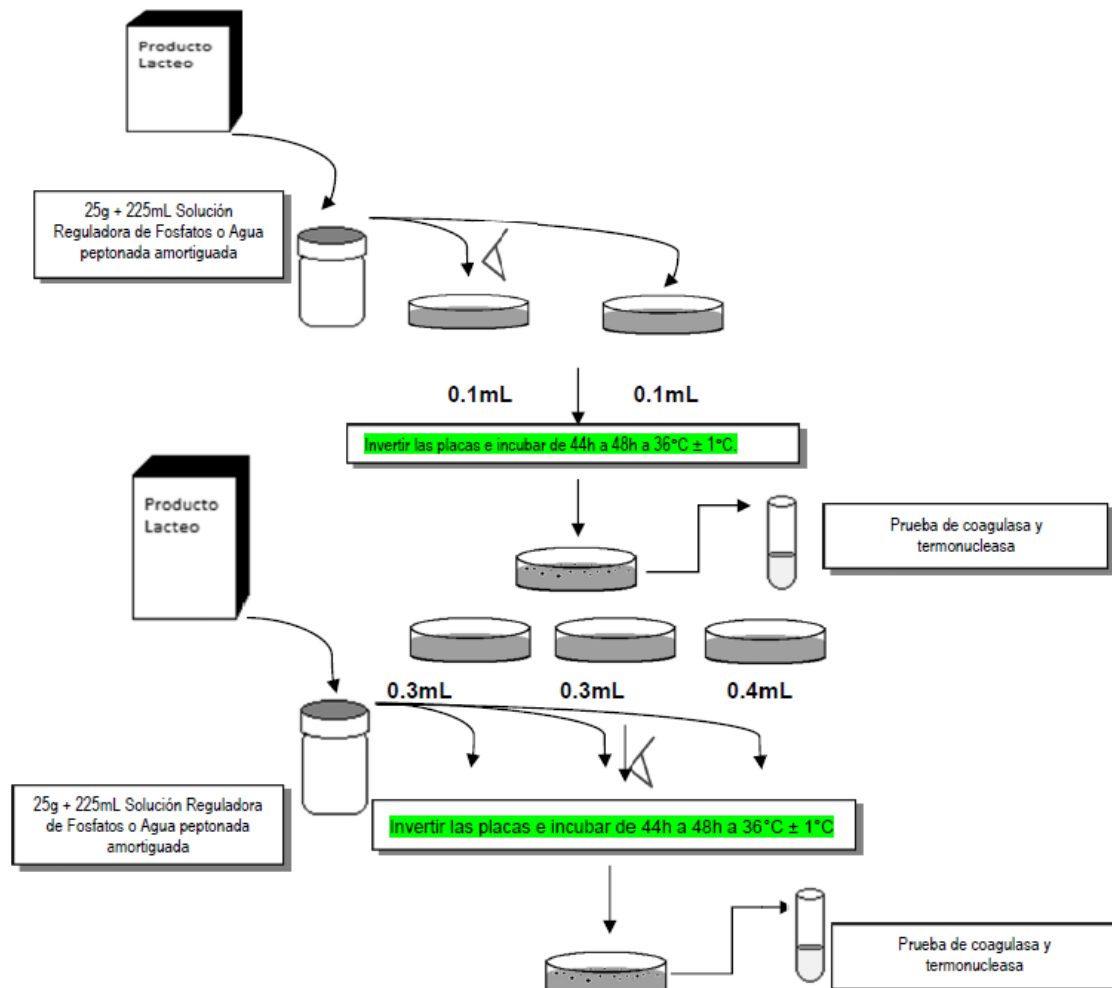
Si se considera que el inóculo fue de 0.1mL habrá que multiplicar por 10 para obtener 58000 UFC/mL o g según la naturaleza de la muestra.

También puede aplicarse la siguiente formula:

$$\text{Cuenta } X[(1/\text{Volumen del inóculo})(1/\text{dilución})]$$

B.7.8 Precisión de la cuenta.

Para razones estadísticas, los intervalos de confianza de este método varían en un 95% de los casos, desde un $\pm 16\%$ a $\pm 52\%$. En la práctica, una mayor variación se puede encontrar, especialmente entre los resultados obtenidos por diferentes analistas.

B.8 Ayuda Visual.

B.9 Composición y preparación de medios de cultivo y reactivos.**B.9.1 Agar Baird Parker.****B.9.1.1 Medio base.****B.9.1.2 Fórmula.**

Triptona	10.0g
Extracto de carne	5.0g
Extracto de levadura	1.0g
Piruvato de sodio	10.0g
Glicina	12.0g
Cloruro de litio .6H ₂ O	5.0g
Agar	15.0 a 20.0g
Agua destilada	1L
pH final 7.0 ± 0.2.	

B.9.1.3 Preparación: Disolver los ingredientes en 950mL de agua destilada con agitación constante y calentamiento. Esterilizar 15 min a 121°C. Si se utiliza inmediatamente, mantenerlo fundido a 48°C-50°C antes de adicionar los ingredientes de enriquecimiento o almacenar el medio solidificado a 4°C ± 1°C hasta 1 mes. Fundir el medio antes de su uso.

Ingredientes de enriquecimiento: telurito y yema de huevo.

Adicionar asépticamente 5mL de yema de huevo-telurito de potasio a temperatura ambiente, a 95mL de la base fundida. Mezclar bien evitando hacer burbujas y vaciar porciones de 15mL-18mL en cajas Petri 15mm x 100mm. El medio debe ser densamente opaco. Secar las placas antes de su uso. Guardar las placas preparadas 20°C-25°C hasta 5 días.

B.9.2 Emulsión de yema de huevo.**B.9.2.1 Preparación.** *(Sólo si una presentación comercial no está disponible).*

Utilizar huevos frescos, separar la yema de la clara.

Mezclar las yemas con cuatro veces el volumen de agua, calentar la mezcla en un baño de agua, controlando la temperatura a 45°C ± 0.5°C por 2h y dejar reposar de 18h a 24h de 0°C a + 5°C, dejar precipitar.

Decantar el sobrenadante líquido y esterilizarlo por filtración, a menos que se haya llevado la separación asépticamente. La emulsión puede ser almacenada de 2°C a 8°C por no más de 72h.

B.9.3 Solución de Telurito de potasio.**B.9.3.1 Fórmula.**

Telurito de potasio (trioxotelurito dipotásico)	1.0g
Agua	100mL

B.9.3.2 Preparación: Disolver el telurito de potasio en agua con un mínimo calentamiento.

Esterilizar por filtración.

La solución puede ser conservada de 2°C a 8°C por 6 meses.

B.9.4 BHI.**B.9.4.1 Fórmula.**

Peptona	10.0g
Infusión cerebro de ternero deshidratado	12.5g
Infusión corazón de res deshidratado	5.0g

Glucosa	2.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Fosfato disódico Na_2HPO_4	2.5g
Agua	1000mL

B.9.4.2 Preparación: Disolver los componentes o el medio completo comercial en agua hirviendo, ajustar el pH para que después de la esterilización se encuentre en 7.4 ± 0.2 a 25°C .

Transferir el contenido a tubos o botellas en cantidades iguales a 10mL. Esterilizar el medio por 20 min a 121°C .

El medio puede ser almacenado por 6 meses en condiciones de refrigeración de 0°C a 5°C .

B.9.5 Plasma de Conejo.

B.9.5.1 Preparación: Utilizar el plasma de conejo que esté disponible comercialmente y rehidratar de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Adicionar el EDTA, en el plasma hidratado.

Si no encuentra plasma de conejo deshidratado comercial diluir plasma de conejo fresco en una proporción 1:3 con agua estéril.

Antes de su uso probar cada lote de plasma de conejo con cepas positivas de *S. aureus* y con cepas negativas.

B.9.6 Agar Azul de Toluidina.

B.9.6.1 Fórmula.

ADN de timo de carnero	0.3g
Agar	10g
CaCl_2 (anhidro)	1.1mg
NaCl	10g
Azul de toluidina O	0.083g
Tris (hidroximetil aminometano)	6.1g
Agua destilada	1L
pH 9.0 final	

B.9.6.2 Preparación: Disolver el Tris (hidroximetil aminometano) en 1L de agua destilada. Ajustar el pH a 9.0 adicionar los ingredientes restantes a excepción del azul de toluidina. Calentar a ebullición para disolver el azul de toluidina en el medio. Distribuir en matraces o tubos de ensaye con tapa de rosca. No es necesario esterilizar si se usa inmediatamente. El medio estéril es estable a temperatura ambiente por 4 meses y es satisfactorio después de varios ciclos de fusión.

Este medio se prepara por ingredientes.

B.9.7 Solución Reguladora de Fosfatos.

B.9.7.1 Fórmula.

Fosfato monopotásico	34.0g
Agua destilada	1L
pH final 7.2 ± 0.2	

B.9.7.2 Preparación: Disolver el fosfato en 500mL de agua destilada y ajustar el pH a 7.2 con solución de hidróxido de sodio 1N. Llevar a 1L con agua destilada. Esterilizar durante 15 min a $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Para diluciones:

Añadir 1.25mL de solución concentrada de reguladora de fosfatos a 1L de agua destilada y ajustar el pH a 7.2 distribuir en frascos de dilución. Esterilizar a $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min.

B.9.8 AST.**B.9.8.1 Fórmula.**

Tripticasa peptona	15g
Fitona peptona	5g
NaCl	5g
Agar	15g
Agua destilada	1L
pH 7.3 ± 0.2	

B.9.8.2 Preparación: Suspender los ingredientes en 1L de agua destilada. Dejar reposar de 5 a 10 min. Calentar con agitación constante para disolver el agar. Hervir por 1 min. Distribuir en tubos, cajas o matraces. Esterilizar a 121°C por 15 min.

Cepas control: *E. coli* y *S. aureus*.

B.9.9 Caldo Rojo de Fenol (para fermentación de carbohidratos).**B.9.9.1 Fórmula.**

Tripticasa o proteona peptona No. 3	10g
NaCl	5g
Extracto de carne (opcional).	1g
Rojo de fenol (7.2mL de solución de rojo de fenol al 0.25%)	0.018g
Agua destilada	1L
pH 7.4 ± 0.2.	
Carbohidrato*	

B.9.9.2 Preparación: Disolver los ingredientes sin el carbohidrato, en 800mL de agua destilada con calentamiento y agitación ocasional. Distribuir en volúmenes de 2mL en tubos de 13mm x 100mm con campana de Durham. Esterilizar a 121°C por 15 min y dejar enfriar. Disolver 20g del carbohidrato en 200mL de agua destilada y esterilizar por filtro de membrana, adicionar asépticamente 0.5mL del filtrado a cada tubo con medio esterilizado y enfriado a menos de 45°C, agitar suavemente para mezclar.

B.9.10 Aceite de parafina estéril.

Puede esterilizar por filtración en membrana de 0.22µm.

B.9.11 Agua peptonada amortiguada.**B.9.11.1 Fórmula.**

Digerido enzimático de caseína	10.0g
NaCl	5.0g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	9.0g
KH ₂ PO ₄	1.5g
Agua	1 000mL

B.9.11.2 Preparación: Disolver los ingredientes en el agua, calentar si es necesario. Ajustar el pH, de tal manera que después de la esterilización sea 7.0 ± 0.2 a 25°C. Distribuir el medio en frascos de capacidad necesaria para obtener las porciones de prueba. Esterilizar en autoclave 15 min a 121°C.

Apéndice C Normativo.**Método de referencia para el aislamiento de *L. monocytogenes*.**

ADVERTENCIA.- Con la finalidad de proteger la salud del personal de laboratorio, se debe considerar que:

- Las pruebas para la determinación de *L. monocytogenes* deberán ser realizadas en laboratorios debidamente equipados y por microbiólogos expertos, cuidando la eliminación de los desechos potencialmente contaminados.
- Las mujeres embarazadas no deberán manipular los cultivos de *L. monocytogenes* bajo ninguna circunstancia.

Establece el método microbiológico para determinar la presencia de *L. monocytogenes* a partir de alimentos para consumo humano nacionales o de importación.

C.1 INTRODUCCIÓN.

Este método permite determinar la presencia o ausencia de *L. monocytogenes* en los productos de consumo, se efectúa por medio de un pre-enriquecimiento selectivo y después su aislamiento en placas de medio de cultivo selectivo y diferencial, con la confirmación mediante pruebas bioquímicas y fisiológicas.

L. monocytogenes es una bacteria que se desarrolla intracelularmente y es causante de Listeriosis. Es uno de los patógenos más virulentos causante de infecciones alimentarias, con una tasa de mortalidad entre un 20% a 30%, más alta que casi todas las restantes tóxicas infecciones alimentarias. *L. monocytogenes* es un bacilo corto Gram positivo, que presenta diploformas dispuestas en "V" y anaerobio facultativo capaz de proliferar en un amplio intervalo de temperaturas (1°C a 45°C). Es catalasa positiva y no presenta cápsula ni espora. Tiene flagelos peritricos, gracias a los cuales presenta movilidad a 30°C o menos, pero es inmóvil a 37°C, temperatura a la cual sus flagelos se inactivan.

C.2 EQUIPO.

C.2.1 Autoclave y horno que alcance 180°C;

C.2.2 Balanza con sensibilidad de 0.1g;

C.2.3 Incubadoras a las diferentes temperaturas: 25°C ± 1°C, 30°C ± 1°C y 36°C ± 1°C;

C.2.4 Potenciómetro;

C.2.5 Homogeneizador peristáltico o licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato, con vasos esterilizables (vidrio o aluminio);

C.2.6 Microscopio, y

C.2.7. Baño de agua a 45°C ± 2°C.

C.3 MATERIALES.

C.3.1 Asa de platino o níquel de 3mm de diámetro o 10µL;

C.3.2 Pipetas graduadas o pipetas automáticas, de diferentes capacidades 10mL, 5mL y 1mL con divisiones de 0.5mL y 0.1mL respectivamente y protegidas con tapón de algodón;

C.3.3 Pipetas de 1mL, con graduaciones de 0.1mL;

C.3.4 Matraces Erlenmeyer de 500mL;

C.3.5 Cajas Petri de vidrio o desechables; diámetro 15mm x 90mm y/o de un diámetro mayor 140mm;

C.3.6 Cucharas, bisturís, cuchillos y pinzas;

C.3.7 Tubos de ensaye de 16mm x 150mm y de 20mm x 100mm;

C.3.8 Tubos para serología de 10mm x 75mm o de 13mm x 100mm;

C.3.9 Gradillas para tubos de ensaye, y

C.3.10 Mecheros Bunsen o Fisher.

C.4 MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.

C.4.1 Caldo Fraser medio, con reducción de la concentración de agentes selectivos;

C.4.2 Caldo Fraser, con la completa concentración de agentes selectivos;

C.4.3 Agar Oxford;

C.4.4 Agar PALCAM;

C.4.5 ASTEL;

C.4.6 CSTEEL;

C.4.7 Agar sangre de cordero;

C.4.8 Caldo carbohidrato (ramnosa y xilosa);

C.4.9 Agar movilidad, y

C.4.10 Solución de Peróxido de hidrógeno.

C.5 CEPAS.

C.5.1 *S. aureus* ATCC 49444, ATCC 25923, CIP 5710;

C.5.2 *R. equi* ATCC 6939, NCTC 1621;

C.5.3 *L. monocytogenes* ATCC 19115;

C.5.4 *L. innocua* ATCC 33090, y

C.5.5 *L. ivanovii* ATCC 19119.

C.6 CONDICIONES DE PRUEBA.

C.6.1 Muestreo.

Es importante que el laboratorio se cerciore de recibir una muestra representativa y que no haya tenido daños o cambios durante el transporte y/o almacenamiento.

El muestreo no es parte del método especificado en el presente método, es recomendable que las partes involucradas en este punto lleguen a un acuerdo al respecto.

C.6.2. Preparación de la muestra.

Al preparar la suspensión inicial, tomar diferentes porciones del alimento. Transferirlo al Caldo Fraser medio, a fin de obtener una relación 1:10. Pesar 25g o mL a frascos de dilución con 225mL del Caldo Fraser medio, para obtener una dilución 1:10 (masa-volumen o volumen-volumen).

Homogeneizar por 1 min o 2 min en licuadora o homogeneizador peristáltico dependiendo del tipo de alimento.

C.7 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.

C.7.1 Enriquecimiento Primario:

Incubar la suspensión inicial (C.6.2) a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 2\text{h}$.

Nota: una coloración oscura puede aparecer, durante la incubación.

C.7.2 Enriquecimiento Secundario:

Transferir 0.1mL del enriquecimiento primario, después de la incubación inicial por $24\text{h} \pm 2\text{h}$, a un tubo conteniendo 10mL del Caldo Fraser.

Incubar el medio inoculado a $48\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

C.7.3 Siembra en medios selectivos e identificación.

Del enriquecimiento primario, después de las $24\text{h} \pm 2\text{h}$ de incubación, inocular 2 placas de agar Oxford y 2 placas de PALCAM por estría cruzada.

Del enriquecimiento secundario incubado a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $48\text{h} \pm 2\text{h}$, inocular 2 placas con agar Oxford y 2 placas con PALCAM por estría cruzada.

Invertir las placas e incubar un juego de agar Oxford y PALCAM a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y el otro a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

NOTA: Las placas con agar PALCAM se pueden incubar en condiciones de microaerofilia (CO_2 5% -12% O_2 5%-15%).

C.7.4 Después de la incubación por 24h; si se observa un crecimiento pobre o si no se observan colonias; volver a incubar por 18h a 24h. Observar las placas para detectar la presencia de colonias presuntivas de *Listeria* spp.

C.7.5 Colonias típicas de *Listeria* spp, en agar Oxford; por lo general crecen a las 24h se observan pequeñas (1mm), grisáceas, rodeadas por un halo oscuro. Después de las 48h de incubación, las colonias se tornan oscuras con posible brillo verdoso de aproximadamente 2mm de diámetro, con halos negros y centros hundidos.

C.7.6 Colonias típicas de *Listeria* spp en agar PALCAM; para placas incubadas en anaerobiosis dejarlas expuestas al aire por 1h, para que recuperen su color de rosa a púrpura. Después de 24h se observa a *Listeria* spp como colonias muy pequeñas, grisáceas o un verde olivo de aproximadamente 1.5mm a 2mm de diámetro, a veces con centros negros, pero siempre con halos oscuros. Después de 48h las colonias de *Listeria* spp se observan de color verde de aproximadamente 1.5mm a 2mm de diámetro, con el centro hundido y rodeadas de un halo negro.

C.7.7 Pruebas Auxiliares Confirmatorias de *Listeria* spp.

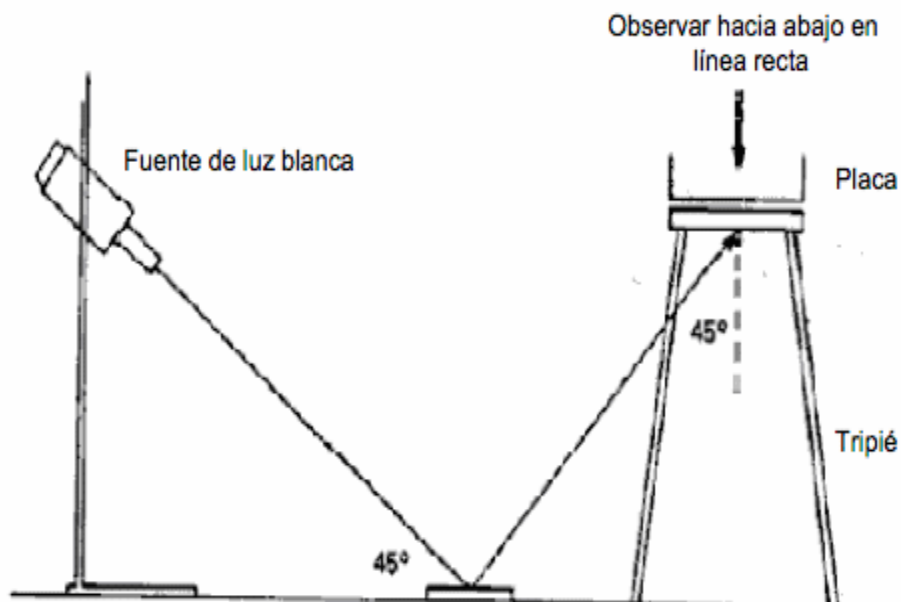
C.7.7.1 Selección de Colonias para su confirmación: Tomar de cada placa de agares selectivos, 5 colonias sospechosas de *Listeria* spp. Si alguna de las placas tiene menos de 5 colonias presuntivas, tomar para su confirmación todas las colonias que hayan crecido.

C.7.7.2 Aislamiento: Sembrar por estría cruzada, para obtener colonias aisladas en cajas con ASTEL. Incubar estas placas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18h a 24h o hasta que el crecimiento sea satisfactorio (no más de 72h).

Las colonias típicas se observan de 1mm a 2mm de diámetro, convexas, incoloras y opacas con borde entero. Si no se obtiene un buen aislamiento, proceder a sembrar nuevamente otra colonia sospechosa de los medios selectivos.

C.7.7.3 Luz de Henry: Esta prueba tiene carácter informativo. Examinar las placas de ASTEL con colonias típicas, con el sistema óptico de Henry se trata de hacer incidir luz transmitida oblicuamente con una lámpara de luz blanca lo suficientemente potente como para iluminar la placa en un ángulo de 45° . Las colonias aparecen de color azul-gris a azul. Se recomienda el uso de cepas (positivo y negativo). La placa puede ser observada a simple vista pero es preferible el uso de un microscopio de disección o lupa.

Nota: La luz de Henry puede ser mejor percibida si ASTEL es delgado aproximadamente 15mL/placa.



C.7.7.4 Reacción de Catalasa: Tomar una colonia aislada y suspenderla en una gota de solución de peróxido de hidrógeno. La inmediata formación de burbujas indica una reacción positiva.

Precaución: la agitación del reactivo con la suspensión del microorganismo debe hacerse con un asa de plástico o palillo de madera estéril, evitando el contacto con el reactivo.

C.7.7.5 Tinción de Gram: Realizar la tinción de Gram a 1 colonia aislada obtenida en ASTEL, se deberán observar bacilos cortos Gram Positivos.

C.7.7.6 Prueba de Movilidad: Tomar 1 colonia aislada de ASTEL, y suspenderla en un tubo conteniendo CST con extracto de levadura. Incubar a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 8h a 24h o hasta que se observe el medio turbio. Depositar una gota de este cultivo entre un portaobjetos y cubreobjetos y examinar en el microscopio. *Listeria* spp se observan como bacilos cortos con un movimiento giratorio (trumbling). Cultivos incubados a la temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pueden ser falsos positivos al exhibir dicho movimiento: se recomienda siempre comparar el cultivo de prueba con cepas conocidas de cocos, bacilos largos o cortos con una movilidad rápida de nado y que no es característico de *Listeria* spp.

C.7.7.6.1. Prueba alternativa de movilidad: Utilizando un asa recta, inocular agar de movilidad picando 1 colonia obtenida en ASTEL. Incubar por 48h a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Examinar el crecimiento alrededor de la picadura. Debido al típico movimiento de *Listeria* spp como resultado un crecimiento característico en forma de sombrilla. Si el crecimiento no es suficiente, incubar por 5 días adicionales y observar la picadura al término de ese tiempo.

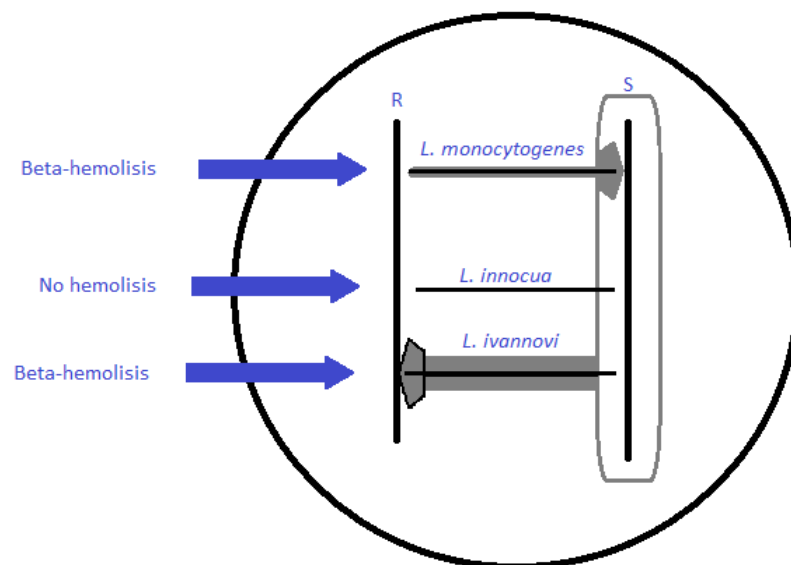
C.7.8 Confirmación de *L. monocytogenes*.

C.7.8.1 Prueba de hemólisis: Si las características morfológicas y fisiológicas, así como la catalasa son indicativos de *Listeria* spp, inocular una placa con agar sangre de carnero al 5% para determinar la actividad hemolítica. Las placas de agar sangre no deben presentar agua de condensación en la superficie del medio. Dibujar una cuadrícula de 20 a 25 espacios en el anverso de la placa de agar sangre de carnero al 5%. Tomar 1 colonia aislada obtenida en ASTEL e inocular por picadura un cuadro por cada cultivo a probar. Simultáneamente utilizar cepas control positiva (*L. monocytogenes*) y negativas (*L. innocua*). Después de la incubación a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 2\text{h}$, examinar las cepas de prueba y los controles. *L. monocytogenes* produce una zona ligeramente clara alrededor del punto de la picadura (β -hemólisis); *L. innocua* no muestra una zona clara alrededor de la picadura. *L. ivanovii* usualmente se observa una zona ancha, clara y delimitada de β -hemólisis. Examinar las placas con una luz brillante para poder comparar las cepas de prueba con los controles.

C.7.8.2 Utilización de Carbohidratos (ramnosa y xilosa): Utilizando una asa bacteriológica, inocular cada uno de los caldos de carbohidratos a probar usando colonias aisladas en ASTEL. Incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 5 días. Una reacción positiva se caracteriza por la producción de ácido y cambio de color a amarillo cuando se utiliza base caldo púrpura de bromocresol adicionado con cada uno de los carbohidratos, que ocurre dentro de las primeras 24h a 48h, si después de 48h de incubación no se observa una reacción positiva clara, dejar incubar hasta 5 días (alternativamente pueden utilizarse sistemas de bioquímicas miniaturizadas o métodos de biología molecular).

C.7.8.3 Prueba de CAMP: En una placa de agar sangre de carnero al 5% sembrar una estría de la cepa de *S. aureus* y otra línea paralela de *R. equi*, de tal forma que queden paralelas y diametralmente opuestas para que entre estas pueda estriarse la cepa sospechosa de *Listeria*, sin que lleguen a tocarse entre sí, (Ver figura C.1). Simultáneamente probar cepas control: *L. monocytogenes*, *L. innocua* y/o *L. ivanovii*. Incubar las placas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 12h a 18h. Observar el sinergismo entre las hemólisis de *S. aureus*, *R. equi* y *Listeria* que se manifiesta como una zona hemolítica intensa. La figura C.1 muestra la disposición de las estrías de los cultivos en una placa de la prueba de CAMP. La hemólisis de *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* se incrementa cerca de la estría de *S. aureus* y la hemólisis de *L. ivanovii* se aumenta cerca de la estría de *R. equi*. Las especies restantes de *Listeria* no son hemolíticas en esta prueba.

Figura C.1 Inoculación e Interpretación de la prueba de CAMP.



C.8 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.**C.8.1 Interpretación de las propiedades morfológicas y fisiológicas de las reacciones bioquímicas.**

Todos las especies de *Listeria* spp son colonias pequeñas, bacilos Gram positivos con movilidad rotativa y catalasa positiva. *L. monocytogenes* se distingue de otras especies por las características enlistadas en la tabla C.1.

Para fines de vigilancia sanitaria, los aislamientos que sean considerados como *L. monocytogenes* deben ser enviados al laboratorio de referencia CCAyAC de la COFEPRIS para realizar la tipificación.

Tabla C.1 Pruebas para la identificación de *Listeria* spp.

Especies	Hemólisis	Producción de ácido		Prueba de CAMP	
		Ramnosa	Xilosa	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. grayi subsp. grayi</i>	-	-	-	-	-
<i>L. grayi subs. murrayi</i>	-	V	-	-	-
V: reacción variable (+): relación débil +: > 90% de reacción positiva -: sin reacción					
Nota: Existen cepas extrañas de <i>L. monocytogenes</i> las cuales no muestran β -hemólisis o una reacción positiva a la prueba de CAMP, bajo las condiciones descritas en el presente apéndice normativo C.					

C.8.2 Cultivos Control.

C.8.2.1 Con el fin de comprobar la habilidad del pre-enriquecimiento y la identificación de *Listeria* spp, se recomienda analizar junto con la prueba cepas control negativo como *S. aureus* y positivo como *L. monocytogenes*.

C.8.3 Expresión de Resultados.

C.8.3.1 De acuerdo con la interpretación de los resultados, informar la presencia o ausencia de *L. monocytogenes*, especificando la masa en g o el volumen en mL de la muestra ensayada.

C.9 Composición y preparación de medios de cultivo y reactivos.**C.9.1 Caldo Fraser Medio.****C.9.1.1 Medio Base.**

Fosfato de sodio di básico

C.9.1.1.1 Fórmula.

Peptona de Carne	5.0g
Triptona	5.0g
Extracto de Carne de Res	5.0g
Extracto de Levadura	5.0g
Cloruro de Sodio	20.0g
Fosfato de sodio monobásico di hidratado	12.0g
Fosfato de Potasio di básico	1.35g
Esculina	1.0g
Agua	1000mL

C.9.1.1.2 Preparación: Disolver los componentes de la base en agua, calentando si es necesario. Ajustar el pH, si es necesario para que después de la esterilización el pH se encuentre entre 7.2 ± 0.2 a 25°C . Distribuir la base en matraces con capacidad apropiada para la prueba. Esterilizar por 15 min en la autoclave a 121°C .

Nota: Se deberá adicionar la solución de cloruro de litio y la solución de ácido nalidíxico después de la esterilización del medio base.

C.9.1.2 Solución de Cloruro de litio.

C.9.1.2.1 Fórmula.

Cloruro de litio	3.0g
Agua	10mL

C.9.1.2.2 Preparación: Adicionar el cloruro de litio al agua. Esterilizar por filtración.

Precauciones, la disolución de cloruro de litio en agua es fuertemente exotérmica e irritante a las mucosas.

C.9.1.3 Solución de ácido nalidíxico.

C.9.1.3.1 Fórmula.

Sales de ácido nalidíxico sódico	0.1g
Solución de Hidróxido de sodio. 0,05 mol/L	10mL

C.9.1.3.2 Preparación: Disolver las sales de ácido nalidíxico en la solución de hidróxido de sodio. Esterilizar por filtración.

C.9.1.4 Solución de clorhidrato de acriflavina.

C.9.1.4.1 Fórmula.

Clorhidrato de acriflavina	0.25g
Agua	100mL

C.9.1.4.2 Preparación: Disolver el clorhidrato de acriflavina en una porción de agua. Esterilizar por filtración.

C.9.1.5 Solución de citrato, amonio hierro III.

C.9.1.5.1 Fórmula.

Citrato de amonio hierro III	5.0g
Agua	100mL

C.9.1.5.2 Preparación: Disolver el Citrato de amonio hierro III en el agua. Esterilizar por filtración.

C.9.1.6 Medio Completo.

Solución de Cloruro de Litio 10mL de solución al 3%.

C.9.1.6.1 Fórmula.

Medio Base	100mL
Solución de Cloruro de Litio	1.0mL
Solución de ácido nalidíxico	0.1mL
Solución de clorhidrato de acriflavina	0.5mL
Solución de citrato, amonio hierro III	1.0mL

C.9.1.6.2 Preparación: Agregar las 4 soluciones por cada porción de 100mL de base inmediatamente antes de usar.

C.9.2 Caldo Fraser.

C.9.2.1 Medio Base.

Fosfato de potasio monobásico.

C.9.2.1.1 Fórmula

Peptona de Carne	5.0g
Tryptona	5.0g
Extracto de Carne de Res	5.0g
Extracto de Levadura	5.0g
Cloruro de Sodio	20.0g
Fosfato de sodio monobásico dihidratado	12.0g
Fosfato de Potasio dibásico	1.35g
Esculina	1.0g
Cloruro de litio	3.0g
Sal de sodio o ácido nalidíxico	0.02g
Agua	1000mL

C.9.2.1.2 Preparación: Disolver los componentes de la base en agua, puede usarse calentamiento. Ajustar el pH, cuando se requiera para que después de la esterilización el pH se encuentre entre 7.2 ± 0.2 a 25°C . Distribuir la base en matraces con capacidad apropiada para la prueba. Esterilizar por 15 min en la autoclave a 121°C .

C.9.2.2 Solución de clorhidrato de acriflavina.

C.9.2.2.1 Fórmula.

Clorhidrato de acriflavina	0.25g
Agua	100mL

C.9.2.2.2 Preparación: Disolver el clorhidrato de acriflavina en una porción de agua. Esterilizar por filtración

C.9.2.3 Solución de citrato, amonio hierro III.

C.9.2.3.1 Fórmula.

Citrato de amonio hierro III	5.0g
Agua	100mL

C.9.2.3.2 Preparación: Disolver el Citrato de amonio hierro III en el agua. Esterilizar por filtración.

C.9.2.4 Medio Completo.

C.9.2.4.1 Preparación: Antes de usar añadir a cada tubo con 10mL del medio base 0.1mL de las soluciones de Clorhidrato de acriflavina y solución de citrato de amonio hierro III. Mezclar vigorosamente.

C.9.3 Agar Oxford.

C.9.3.1 Agar Base.

C.9.3.1.1 Fórmula.

Peptonas	23.0g
Almidón	1.0g
Cloruro de sodio	5.0g

Agar	De 9 a 18g ⁽¹⁾
Esculina	0.8g
Citrato de amonio, hierro III	0.5g
Cloruro de Litio	15.0g
Agua	960mL

⁽¹⁾ Dependiendo de la fuerza gel del agar.

C.9.3.1.2 Preparación: Disuelva los componentes o el medio deshidratado completo en agua hirviendo. Ajuste el pH si es necesario para que después de la esterilización el pH se encuentre entre 7.2 ± 0.2 a 25°C. Esterilizar por 15 min en la autoclave a 121°C.

C.9.3.2 Suplemento para 1000mL del Agar Oxford.

C.9.3.2.1 Fórmula.

Cicloheximida	400mg
Sulfato de Colistina	20mg
Clorhidrato de Acriflavina	5.0mg
Cefotetán	2.0mg
Fosfomicina	10mg
Etanol	5.0mL
Agua	5.0mL

C.9.3.2.2 Preparación: Disuelva los componentes o el medio deshidratado completo en una mezcla de etanol-agua. Esterilizar por filtración.

C.9.3.3 Medio completo.

C.9.3.3.1 Preparación: Enfriar la base a aproximadamente 47°C y agregue el suplemento asépticamente. Vierta el medio en cajas Petri, en aproximadamente 15mL. Almacene el medio en oscuridad, evite el contacto con la luz.

C.9.4 Agar PALCAM.

C.9.4.1 Agar Base.

C.9.4.1.1 Fórmula.

Peptonas	23.0g
Almidón	1.0g
Cloruro de Sodio	5.0g
Extracto de Levadura	3.0g
Agar	12.0g a 20.0g
Glucosa	0.5g
Manitol	10.0g
Esculina	0.8 a 1.0g
Cloruro de Litio	15.0g
Citrato de amonio, hierro III	0.5g
Rojo de fenol	0.08g
Agua	1000mL

C.9.4.1.2 Preparación: Disolver los componentes de la base en agua, calentando si es necesario. Ajustar el pH, si es necesario para que después de la esterilización el pH se encuentre entre 7.2 ± 0.2 a 25°C . Dispensar la base en matraces con capacidad apropiada para la prueba. Esterilizar por 15 min en la autoclave a 121°C .

C.9.4.2 Solución de Sulfato de Polimixina B.

C.9.4.2.1 Fórmula.

Sulfato de Polimixina B (100, 000 UI)	0.1g
Agua	100mL

C.9.4.2.2 Preparación: Disolver el Sulfato de Polimixina B en agua. Esterilizar por filtración.

C.9.4.3 Solución de clorhidrato de acriflavina.

C.9.4.3.1 Fórmula.

Clorhidrato de acriflavina	0.05g
Agua	100mL

C.9.4.3.2 Preparación: Disolver el Clorhidrato de acriflavina en agua. Esterilizar por filtración.

C.9.4.4 Solución de Ceftazidima sódica pentahidratada.

C.9.4.4.1 Fórmula.

Ceftazidima sódica pentahidratada	0.116g
Agua	100mL

C.9.4.4.2 Preparación: Disuelva la Ceftazidima Sódica Pentahidratada en agua. Esterilice por filtración.

C.9.4.5 Medio completo.

C.9.4.5.1 Fórmula.

Base Agar PALCAM	960mL
Solución de Sulfato de Polimixina B	10mL
Solución de Clorhidrato de acriflavina	10mL
Solución de Ceftazidima sódica pentahidratada	2mL

C.9.4.5.2 Preparación: A la base de agar fundida a 45°C agregar las 3 soluciones, mencionadas en la fórmula, mezclar vigorosamente entre cada adición. Para la preparación en placa añadir al número apropiado de cajas Petri aproximadamente 15mL del medio completo recién preparado, permita solidificar. Almacene el medio lejos de la luz.

C.9.5 Agar ASTEL.

C.9.5.1 Fórmula.

Extracto de levadura	6.0g
Agar	de 9 a $18\text{g}^{(2)}$
Agua	1000mL
Triptona	17.0g
Peptona de Soya	3.0g
Cloruro de sodio	5.0g

⁽²⁾ Dependiendo de la fuerza del agar

C.9.5.2 Preparación: Disuelva los componentes o el medio completo deshidratado en agua hirviendo. Ajustar el pH si es necesario a modo que después de la esterilización sea de 7.3 ± 0.2 a 25°C . Esterilice por 15 min en autoclave a 121°C . Dispensar en cajas Petri aproximadamente 15mL y dejar solidificar.

C.9.6 CSTE.

C.9.6.1 Fórmula.

Extracto de levadura	6.0g
Agua	1000mL
Triptona	17.0g
Peptona de Soya	3.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Fosfato de potasio	2.5g
Glucosa	2.5g

C.9.6.2 Preparación: Disuelva los componentes o el medio completo deshidratado en agua hirviendo. Ajustar el pH de ser necesario a modo que después de la esterilización sea de 7.3 ± 0.2 a 25°C . Vierta el medio en matraces, frascos o tubos de capacidad apropiada para las pruebas. Esterilice por 15 min en autoclave a 121°C .

C.9.7 Agar Sangre de cordero.

C.9.7.1 Fórmula.

Peptona de carne	15g
Digerido de hígado	2.5g
Extracto de levadura	5g
Cloruro de sodio	5g
Agar	de 9g a $18\text{g}^{(1)}$
Agua	1000mL
Sangre de Cordero Desfibrada	5mL a 7mL

⁽¹⁾ Dependiendo de la fuerza del agar

C.9.7.2 Preparación: Disuelva los componentes en agua hirviendo con excepción de la sangre. Ajustar el pH si es necesario a modo que después de la esterilización sea de 7.2 ± 0.2 a 25°C vierta el medio en matraces de capacidad apropiada, para las pruebas. Esterilice por 15 min en autoclave a 121°C . Agregar la sangre desfibrada a la base previamente atemperada a 47°C , mezclar bien. Vierta el medio en cajas Petri en proporciones adecuadas para las pruebas, permita solidificar.

C.9.8 Caldo Carbohidratos (Ramnosa y Xilosa).

C.9.8.1 Medio Base.

C.9.8.1.1 Fórmula.

Proteasa de Peptona	10g
Extracto de Carne	1g
Cloruro de sodio	5g
Purpura de Bromocresol	0.02g
Agua	1000mL

C.9.8.1.2 Preparación: Disuelva los componentes en agua, calentar si es necesario. Ajustar el pH a modo que después de la esterilización sea de 6.8 ± 0.2 a 25°C . Vierta el medio en tubos de capacidad apropiada, para las pruebas. Esterilice por 15 min en autoclave a 121°C .

C.9.8.2 Solución de Carbohidrato.

C.9.8.2.1 Fórmula.

Carbohidrato (L-Ramnosa o D-Xilosa)	5g
Agua	100mL

C.9.8.2.2 Preparación: Disuelva por separado cada carbohidrato en 100mL de agua, esterilizar por filtración.

C.9.8.3 Medio Completo.

C.9.8.3.1 Preparación: En condiciones asépticas para cada carbohidrato adicionar 10mL de solución del carbohidrato a 90mL de la base.

C.9.9 Agar de Movilidad.

C.9.9.1 Fórmula.

Peptona de Caseína	20.0g
Peptona de Carne	6.1g
Agar	3.5g
Agua	1000mL

C.9.9.2 Preparación: Disuelva los componentes en agua hirviendo. Ajustar el pH si es necesario a modo que después de la esterilización sea de 7.3 ± 0.2 a 25°C . Vierta el medio en tubos en cantidades de 5mL y esterilice por 15 min en autoclave a 121°C .

C.9.10 Solución de Peróxido de Hidrógeno.

C.9.10.1 Preparación: Utilizar diez volúmenes de solución al 3% volumen/volumen.

Apéndice D Normativo.

Método alternativo para la estimación de Enterococos fecales en agua. Técnica de tubos múltiples.

D.1 INTRODUCCIÓN.

Este grupo fue separado del resto de los enterococos fecales debido a que son indicadores relativamente específicos de contaminación fecal. Sin embargo, algunos enterococos intestinales aislados de agua, pueden ocasionalmente tener un origen de otras fuentes, incluyendo suelos aun en ausencia de contaminación fecal. El grupo enterococo intestinal puede ser usado como un índice de contaminación fecal.

Los enterococos intestinales son relativamente tolerantes al NaCl y pH alcalino. La mayoría de las especies no se multiplican en agua.

La ventaja de este grupo sobre otros grupos indicadores (coliformes y *E. coli*) es que sobreviven durante más tiempo en medios acuáticos.

La presencia de enterococos intestinales evidencia una contaminación fecal reciente, así como la necesidad de llevar a cabo acciones en aquellas fuentes de abastecimiento con un inadecuado tratamiento de potabilización.

En la presente Norma se describen 3 técnicas para cuantificar y estimar la presencia de enterococos en agua para uso y consumo humano, agua envasada y hielo, agua de uso recreativo (dulce y salobre): 1. Técnica de filtración por membrana, 2. Técnica del NMP y 3. Técnica del sustrato cromogénico definido.

La técnica de NMP es un método de estimación probabilística de la densidad bacteriana presente en una muestra, basada en la dilución de la misma y sembrada en réplicas de tubos con caldo selectivo (caldo azida dextrosa), en los cuales después de un periodo de incubación de 24h- 48h a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, se observa la presencia de turbiedad en cada tubo.

La prueba confirmativa consiste en sembrar cada uno de los tubos que presenten turbiedad, en medio selectivo para enterococos de Pfizer. Después de un periodo de incubación, las colonias de color café a negro y un halo café debido a la hidrólisis de la esculina, son sembradas en caldo BHI con 6.5% de NaCl e incubadas a $45^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. El desarrollo en este medio confirma la presencia de enterococos.

D.2 MATERIALES.

D.2.1 Botellas de dilución de vidrio de boro silicato o frascos de polipropileno;

D.2.2 Pipetas serológicas de 10mL;

D.2.3 Pipetas serológicas de 1mL;

D.2.4 Asas bacteriológicas;

D.2.5 Tubos de ensaye de 16mm x 150mm con tapón de rosca;

D.2.6 Cajas Petri de vidrio de borosilicato o plástico estériles de 100mm x 150mm;

D.2.7 Propipeta, y

D.2.8 Gradillas.

D.3 APARATOS E INSTRUMENTOS.

D.3.1 Incubadora que evite variaciones mayores de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ con termómetro calibrado o verificado;

D.3.2 Autoclave;

D.3.3 Balanza granataria con sensibilidad de al menos 0.1g;

D.3.4 Horno para esterilizar, y

D.3.5 Baño de agua a $45^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$.

D.4 MEDIOS DE CULTIVO.

D.4.1 Caldo azida dextrosa;

D.4.2 ABEA, y

D.4.3 BHI

D.5 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.

D.5.1 MEDIDAS DE SEGURIDAD.

Seguir las indicaciones precautorias que se señalan en el apartado de preparación de medios de cultivo.

D.5.2 MEDIDAS DE CONTROL DE CALIDAD.

El laboratorio debe tener implementado un sistema de control de calidad para asegurar que los materiales, equipos, reactivos, medios de cultivo y técnicas sean adecuados para la prueba.

D.5.3 ÍNDICES DE REPRODUCIBILIDAD Y REPETIBILIDAD.

Basado en una distribución normal, el 95% de las medias de cada grupo de resultados analíticos deben estar entre +2 y -2 desviaciones estándar con respecto a la media de las medias.*

La precisión del analista deberá estar dentro de un 5%*.

*Fuente: Manual of food quality control 12. Quality assurance in the food control microbiological laboratory. Food and Agriculture Organization (FAO).

D.5.4 RECOMENDACIONES GENERALES PREVIAS AL ANÁLISIS DE LA MUESTRA.

Homogeneización de la muestra.- Las muestras en frascos con un espacio vacío (de al menos 2.5cm), pueden homogeneizarse por inversión rápida veinticinco veces. Las muestras en frascos que tengan de 2/3 a 3/4 de lleno, deberán agitarse 25 movimientos de arriba abajo en un arco de 30cm completados en un tiempo de 7s, para asegurar una unidad analítica representativa.

D.5.5 CONDICIONES DE PRUEBA.

Trabajar en condiciones asépticas en un área limpia y descontaminada. Todo el material que esté en contacto con la muestra debe estar estéril.

D.5.6 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

Descontaminar el exterior de los contenedores de la muestra con etanol o isopropanol al 70%. Realizar diluciones decimales cuando se estime que la carga de enterococos es alta.

D.5.7 Prueba presuntiva.

D.5.7.1 El tamaño de la porción de muestra analizada dependerá de su tipo (agua para uso y consumo humano, agua envasada y hielo, agua de fuentes de abastecimiento y aguas de uso recreativo dulce y salobre). Utilizar 5 porciones de 20mL o 10 porciones de 10mL inoculados a tubos con caldo azida dextrosa (consultar la sección de medios de cultivo para las concentraciones). Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 2\text{h}$. La presencia de turbiedad en los tubos debida al desarrollo microbiano, se considera como prueba presuntiva positiva.

D.5.8 Prueba confirmativa.

D.5.8.1 A partir de cada tubo con turbiedad, transferir una asada a placas de ASPE. Incubar las placas invertidas a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 2\text{h}$. El desarrollo de colonias de color café oscuro a negro con halos cafés, confirman la presencia de estreptococos fecales.

Transferir al menos una colonia característica por tubo a tubos con caldo BHI con 6.5% de NaCl a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por $48\text{h} \pm 4\text{h}$ y caldo BHI a $45^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 2\text{h}$. El crecimiento en ambos medios confirma la presencia de enterococos.

D.5.9 Cálculos.

D.5.9.1 Calcular la densidad de enterococos por el NMP en 100mL con el número de tubos confirmados consultando las Tablas 1 o 2.

Tabla D. 1 Número más probable por 100mL de muestra de agua o hielo con un intervalo de confianza del 95%, utilizado 5 tubos con 20mL de muestras.

No. De Tubos positivos	NMP/100mL	95% de Límite de Confianza (aproximado)	
		Inferior	Superior
0	<1.1	-	3.5
1	1.1	0.051	5.4
2	2.6	0.40	8.4
3	4.6	1.0	13
4	8.0	2.1	23
5	>8.0	3.4	-

Referencia: American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21th edition 2005. Washington DC.

Tabla D.2 Número más probable por 100mL de muestra e intervalos de confianza del 95% utilizado 10 tubos con 10mL de muestras.

No. de tubos positivos	NMP/100mL	Límite de confianza	
		Inferior	Superior
0	<1.1	-	3.4
1	1.1	0.051	5.9
2	2.2	0.37	8.2
3	3.6	0.91	9.7
4	5.1	1.6	13
5	6.9	2.5	15
6	9.2	3.3	19
7	12	4.8	24
8	16	5.8	34
9	23	8.1	53
10	>23	13	-

Referencia: American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21th edition 2005. Washington DC.

D.5.9.2 Considerar en el resultado final la(s) dilución(es) realizadas.

D.5.9.3 Para el caso de agua para uso recreativo utilizar cinco tubos con Caldo azida dextrosa por cada porción de 10mL, 1mL y 0.1mL de muestra. Para inóculos de 10mL de agua, preparar el medio a doble concentración y para volúmenes de 1mL y 0.1mL a concentración sencilla. Hacer diluciones decimales de la muestra cuando se considere necesario con solución reguladora de fosfatos o agua peptonada. Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 24h a 48h. La presencia de turbiedad en los tubos debida al desarrollo microbiano, se considera como prueba presuntiva positiva. Continuar como se indica para la prueba confirmativa.

D.5.9.4 Calcular la densidad total del grupo Enterococos por el NMP en 100mL con el número de tubos confirmados consultando la Tabla D.3.

Tabla No. D.3 NMP para 100mL de muestra cuando se usan 5 porciones en cada una de tres diluciones con series geométricas.

No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos			
10mL	1 mL	0.1mL	NMP	10mL	1 mL	0.1mL	NMP	10mL	1 mL	0.1mL	NMP	10mL	1 mL	0.1mL	NMP	10mL	1 mL	0.1mL	NMP	10mL	1 mL	0.1mL	NMP
0	0	0	<1.8	1	0	0	2	2	0	0	4.5	3	0	0	7.8	4	0	0	13	5	0	0	23
0	0	1	1.8	1	0	1	4	2	0	1	6.8	3	0	1	11	4	0	1	17	5	0	1	31
0	0	2	3.6	1	0	2	6	2	0	2	9.1	3	0	2	13	4	0	2	21	5	0	2	43
0	0	3	5.4	1	0	3	8	2	0	3	12	3	0	3	16	4	0	3	25	5	0	3	58
0	0	4	7.2	1	0	4	10	2	0	4	14	3	0	4	20	4	0	4	30	5	0	4	76
0	0	5	9.0	1	0	5	12	2	0	5	16	3	0	5	23	4	0	5	36	5	0	5	95
0	1	0	1.8	1	1	0	4	2	1	0	6.8	3	1	0	11	4	1	0	17	5	1	0	33
0	1	1	3.6	1	1	1	6.1	2	1	1	9.2	3	1	1	14	4	1	1	21	5	1	1	46
0	1	2	5.5	1	1	2	8.1	2	1	2	12	3	1	2	17	4	1	2	26	5	1	2	64
0	1	3	7.3	1	1	3	10	2	1	3	14	3	1	3	20	4	1	3	31	5	1	3	84
0	1	4	9.1	1	1	4	12	2	1	4	17	3	1	4	23	4	1	4	35	5	1	4	110
0	1	5	11	1	1	5	14	2	1	5	19	3	1	5	27	4	1	5	42	5	1	5	130
0	2	0	3.7	1	2	0	6.1	2	2	0	9.3	3	2	0	14	4	2	0	22	5	2	0	49
0	2	1	5.5	1	2	1	8.2	2	2	1	12	3	2	1	17	4	2	1	26	5	2	1	70
0	2	2	7.4	1	2	2	10	2	2	2	14	3	2	2	20	4	2	2	32	5	2	2	95
0	2	3	9.2	1	2	3	12	2	2	3	17	3	2	3	24	4	2	3	38	5	2	3	120
0	2	4	11	1	2	4	15	2	2	4	19	3	2	4	27	4	2	4	44	5	2	4	150
0	2	5	13	1	2	5	17	2	2	5	22	3	2	5	31	4	2	5	50	5	2	5	180
0	3	0	5.6	1	3	0	8.3	2	3	0	12	3	3	0	17	4	3	0	27	5	3	0	79
0	3	1	7.4	1	3	1	10	2	3	1	14	3	3	1	21	4	3	1	33	5	3	1	110
0	3	2	9.3	1	3	2	13	2	3	2	17	3	3	2	24	4	3	2	39	5	3	2	140
0	3	3	11	1	3	3	15	2	3	3	20	3	3	3	28	4	3	3	45	5	3	3	180
0	3	4	13	1	3	4	17	2	3	4	22	3	3	4	31	4	3	4	52	5	3	4	210
0	3	5	15	1	3	5	19	2	3	5	25	3	3	5	35	4	3	5	59	5	3	5	250
0	4	0	7.5	1	4	0	11	2	4	0	15	3	4	0	21	4	4	0	34	5	4	0	130
0	4	1	9.4	1	4	1	13	2	4	1	17	3	4	1	24	4	4	1	40	5	4	1	170
0	4	2	11	1	4	2	15	2	4	2	20	3	4	2	28	4	4	2	47	5	4	2	220
0	4	3	13	1	4	3	17	2	4	3	23	3	4	3	32	4	4	3	54	5	4	3	280
0	4	4	15	1	4	4	19	2	4	4	25	3	4	4	36	4	4	4	62	5	4	4	350
0	4	5	17	1	4	5	22	2	4	5	28	3	4	5	40	4	4	5	69	5	4	5	430
0	5	0	9.4	1	5	0	13	2	5	0	17	3	5	0	25	4	5	0	41	5	5	0	240
0	5	1	11	1	5	1	15	2	5	1	20	3	5	1	29	4	5	1	48	5	5	1	350
0	5	2	13	1	5	2	17	2	5	2	23	3	5	2	32	4	5	2	56	5	5	2	540
0	5	3	15	1	5	3	19	2	5	3	26	3	5	3	37	4	5	3	64	5	5	3	920
0	5	4	17	1	5	4	22	2	5	4	29	3	5	4	41	4	5	4	72	5	5	4	1600
0	5	5	19	1	5	5	24	2	5	5	32	3	5	5	45	4	5	5	81	5	5	5	>1600

Referencia: AOAC 18 ° Edición. Revisión 2, 2007.

D.5.10 Interpretación de resultados.

El crecimiento en ambos medios caldo BHI con 6.5% de NaCl incubado a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y en caldo BHI a $45^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ confirma la presencia de enterococos fecales.

D.6 Criterios de validez de la prueba.

Esta prueba tiene validez cuando todos los tubos de la menor dilución sean positivos y todos los tubos de la dilución mayor sean negativos o la combinación de ambos cuando la muestra contenga enterococos o cuando se trate de un cultivo control inoculado con 100 UFC.

D.7 Informe de prueba.

Informar como: Enterococos NMP/100mL.

D.8 MEDIOS DE CULTIVO.

Añadir el siguiente párrafo: De preferencia utilizar medios de cultivo comerciales. Seguir las instrucciones del fabricante para almacenar y eliminar después de su preparación. Si los medios de cultivo se deben preparar a partir de los ingredientes básicos, seguir las indicaciones descritas a continuación.

D.8.1 Caldo azida dextrosa*.**D.8.1.1 Fórmula.**

INGREDIENTES	CANTIDAD			
	Concentración 1x	Concentración 2x	Concentración 3x	Concentración 6x
	1mL o 0.1mL de muestra con 10mL de caldo	10mL muestra con 10mL de caldo	20mL muestra con 10mL de caldo	100mL muestra con 20mL de caldo
Extracto de Carne	4.5g	9.0g	13.5g	27.0g
Tryptona o polipeptona	15.0g	30.0g	45.0g	90.0g
Glucosa	7.5g	15.0g	22.5g	45.0g
NaCl	7.5g	15.0g	22.5g	45.0g
Azida de Sodio, NaN_3 ,	0.2g	0.4g	0.6g	1.2g
Agua	1L	1L	1L	1L

D.8.1.2 Preparación: Disolver los ingredientes en 1L de agua. Esterilizar a 121°C durante 15min. El pH después de la esterilización debe ser de 7.2 ± 0.2 a 25°C.

***PRECAUCIÓN:** La azida de sodio es tóxica y mutagénica. Manejar con precaución y evitar el contacto con este compuesto. Puede formar compuestos explosivos si tiene contacto con metal.

D.8.2 ABEA.**D.8.2.1 Fórmula.**

Ingredientes	Cantidad
Peptona C (Tryptona)	17.0g
Peptona B (Proteosa peptona No. 3)	3.0g
Extracto de Levadura	5.0g
Bilis bacteriológica	10.0g
Cloruro de Sodio	5.0g
Citrato de Sodio	1.0g
Esculina	1.0g
Citrato Férrico amónico	0.5g
Azida de Sodio, NaN_3	0.15g
Agar	15.0g
Agua	1.0L

D.8.2.2 Preparación: Disolver los ingredientes en 1L de agua. Esterilizar a 121°C durante 15min. El pH después de la esterilización debe ser de 7.1 ± 0.2 a 25°C. Dejar enfriar y mantener el medio no más de 4h antes de vaciarlo a una temperatura de 45°C a 50°C.

***PRECAUCIÓN:** La azida de sodio es tóxica y mutagénica. Manejar con precaución y evitar el contacto con este compuesto. Puede formar compuestos explosivos si tiene contacto con metal.

D.8.3 BHI con 6.5% de NaCl.**D.8.3.1 Fórmula.**

Ingredientes	Cantidad
Infusión de cerebro de ternera a partir de 200.0g	7.7g
Infusión de corazón de res a partir de 250.0g	9.8g
Proteosa peptona	10.0g

Glucosa	2.0g
Cloruro de sodio NaCl	65.0g
Fosfato disódico hidrogenado Na ₂ HPO ₄	2.5g
Agua	1L

D.8.3.2 Preparación: Disolver los ingredientes en 1L de agua. Distribuir en tubos de ensaye. Esterilizar a 121°C durante 15 min. El pH después de la esterilización debe ser de 7.4 ± 0.2 .

Apéndice E Normativo.

Método de referencia “Sustrato cromogénico definido y fluorogénico para determinar Enterococos en agua”.

E.1 INTRODUCCIÓN.

Este método de prueba se basa en la detección de enterococos, tales como *E. faecium*, *E. faecalis* en agua potable, fuentes de abastecimiento, agua de uso recreativo (dulce y salobre), agua envasada y hielo. Cuando el reactivo (comercialmente disponible) es adicionado a la muestra e incubado a $41^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ por $24\text{h} \pm 2\text{h}$, se produce una fluorescencia dada por los Enterococos que metabolizan el indicador nutritivo. Esta prueba permite detectar hasta 1 UFC/100mL de Enterococos en la muestra a analizar.

E.2 MATERIALES.

E.2.1 Vasos estériles no fluorescentes;

E.2.2 Charolas con 51 celdas de un solo tamaño;

E.2.3 Charolas con 48 celdas pequeñas y 48 celdas grandes;

E.2.4 Tubos de ensaye de 20mm x 150mm, y

E.2.5 Tubos de ensaye de 16mm x 150mm.

E.3 APARATOS E INSTRUMENTOS.

E.3.1 Selladora de charolas de cuantificación (comercialmente disponibles);

E.3.2 Lámpara de luz UV de 6 watts con una longitud de onda de 366nm;

E.3.3 Incubadora a $41^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ de aire o baño de agua, y

E.3.4 Termómetro con variaciones de $\pm 0.5^\circ\text{C}$ con un intervalo de 10°C a 50°C calibrado y/o verificado.

E.4 PROCEDIMIENTO.

E.4.1 Interferencia: En el caso de agua marina la presencia de *Bacillus* puede interferir con la prueba en muestras de agua (salobres) con una conductividad por arriba de 20,000 $\mu\text{Siemens/cm}$ a 25°C . Por lo que es necesario hacer una dilución 1:10 con agua estéril (deionizada o destilada).

E.4.2 Presencia/Ausencia.

E.4.2.1 Las muestras deben alcanzar una temperatura ambiente (18°C a 27°C). Separar cuidadosamente un paquete (que contiene el reactivo) de la tira. Golpear el paquete para asegurar que todo el polvo se vaya al fondo. Abrir el paquete rompiendo la parte superior de la línea punteada. No tocar la parte expuesta de la misma. Agregar el reactivo a 100mL de una muestra de agua, la cual está en un recipiente estéril, transparente y no fluorescente o comercialmente disponible. Cubrir y sellar asépticamente el recipiente. Agitar hasta disolución del polvo. Incubar por $24\text{h} \pm 2\text{h}$ a $41^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$. Observar la fluorescencia a las 24h con la lámpara de UV de 6 watts y 366nm de longitud onda en un cuarto oscuro. Asegurarse que la luz se encuentre alejada de sus ojos y dirigida hacia la muestra. Si se observa fluorescencia, se confirma entonces la presencia de enterococos.

E.4.3 NMP Procedimiento de enumeración para 100mL de muestra.

E.4.3.1 Las muestras deben alcanzar una temperatura ambiente (18°C a 27°C). Separar cuidadosamente un paquete (que contiene el reactivo) de la tira. Golpear el paquete para asegurar que todo el polvo se vaya al fondo. Abrir el paquete rompiendo la parte superior de la línea punteada. No tocar la parte expuesta de la misma. Agregar el reactivo a 100mL de una muestra de agua, la cual está en un recipiente estéril, transparente y no fluorescente o comercialmente disponible. Cubrir y sellar asépticamente el recipiente. Agitar hasta disolución del polvo. Vaciar la muestra con el reactivo dentro de la charola de cuantificación, evitar el contacto con la hoja de la charola y el sello (consultar el instructivo del reactivo). Incubar $24\text{h} \pm 2\text{h}$ a $41^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$. Observar la fluorescencia a las $24\text{h} \pm 2\text{h}$ con la lámpara de UV de 6 watts y 366nm de longitud onda en un cuarto oscuro. Asegurar que la luz se encuentre alejada de sus ojos y dirigida hacia la muestra. Si se observa fluorescencia, se confirma entonces la presencia de enterococos. Contar el número de celdas positivas (fluorescencia). Interpolarse en las Tablas (ver Tabla E.1 y Tabla E.2), proporcionada por el fabricante para determinar el NMP/100mL. El NMP en 100mL de muestra equivale, en un 95% de confianza a las UFC presentes en 100mL.

E.4.4 Cálculos.

Para determinar presencia/ausencia no hay cálculos que realizar. Para la cuantificación referirse a las Tablas de NMP correspondientes. Considerar en los cálculos la dilución cuando proceda.

Tabla E.1 de NMP para charolas de 51 celdas.

No. de celdas positivas	NMP/100mL de muestra	Límite del 95 % de confianza	
		Bajo	Alto
0	< 1	0,0	3,7
1	1,0	0,3	5,6
2	2,0	0,6	7,3
3	3,1	1,1	9,0
4	4,2	1,7	10,7
5	5,3	2,3	12,3
6	6,4	3,0	13,9
7	7,5	3,7	15,5
8	8,7	4,5	17,1
9	9,9	5,3	18,8
10	11,1	6,1	20,5
11	12,4	7,0	22,1
12	13,7	7,9	23,9
13	15,0	8,8	25,7
14	16,4	9,8	27,5
15	17,8	10,8	29,4
16	19,2	11,9	31,3
17	20,7	13,0	33,3
18	22,2	14,1	35,2
19	23,8	15,3	37,3
20	25,4	16,5	39,4
21	27,1	17,7	41,6
22	28,8	19,0	43,9
23	30,6	20,4	46,3
24	32,4	21,8	48,7
25	34,4	23,3	51,2
26	36,4	24,7	53,9
27	38,4	26,4	56,6
28	40,6	28,0	59,5
29	42,9	29,7	62,5
30	45,3	31,5	65,6
31	47,8	33,4	69,0
32	50,4	35,4	72,5
33	53,1	37,5	76,2
34	56,0	39,7	80,1
35	59,1	42,0	84,4
36	62,4	44,6	88,8
37	65,9	47,2	93,7
38	69,7	50,0	99,0
39	73,8	53,1	104,8
40	78,2	56,4	111,2
41	83,1	59,9	118,3
42	88,5	63,9	126,2
43	94,5	68,2	135,4
44	101,3	73,1	146,0
45	109,1	78,6	158,7
46	118,4	85,0	174,5
47	129,8	92,7	195,0
48	144,5	102,3	224,1
49	165,2	115,2	272,2
50	200,5	135,8	387,6
51	> 200,5	146,1	Infinito

Tabla No. E.2 de NMP (UFC/100mL) para charolas de 48 celdas pequeñas y 48 celdas grandes.

No. Large Wells positive	No. Small Wells Positive																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0	<1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0	13.0	14.1	15.1	16.1	17.1	18.1	19.1	20.2	21.2	22.2	23.3	24.3
1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.1	8.1	9.1	10.1	11.1	12.1	13.2	14.2	15.2	16.2	17.3	18.3	19.3	20.4	21.4	22.4	23.5	24.5	25.6
2	2.0	3.0	4.1	5.1	6.1	7.1	8.1	9.2	10.2	11.2	12.2	13.3	14.3	15.4	16.4	17.4	18.5	19.5	20.6	21.6	22.7	23.7	24.8	25.8	26.9
3	3.1	4.1	5.1	6.1	7.2	8.2	9.2	10.3	11.3	12.4	13.4	14.5	15.5	16.5	17.6	18.6	19.7	20.8	21.8	22.9	23.9	25.0	26.1	27.1	28.2
4	4.1	5.2	6.2	7.2	8.3	9.3	10.4	11.4	12.5	13.5	14.6	15.6	16.7	17.8	18.8	19.9	21.0	22.0	23.1	24.2	25.3	26.3	27.4	28.5	29.6
5	5.2	6.3	7.3	8.4	9.4	10.5	11.5	12.6	13.7	14.7	15.8	16.9	17.9	19.0	20.1	21.2	22.2	23.3	24.4	25.5	26.6	27.7	28.8	29.9	31.0
6	6.3	7.4	8.4	9.5	10.6	11.6	12.7	13.8	14.9	16.0	17.0	18.1	19.2	20.3	21.4	22.5	23.6	24.7	25.8	26.9	28.0	29.1	30.2	31.3	32.4
7	7.5	8.5	9.6	10.7	11.8	12.8	13.9	15.0	16.1	17.2	18.3	19.4	20.5	21.6	22.7	23.8	24.9	26.0	27.1	28.3	29.4	30.5	31.6	32.8	33.9
8	8.6	9.7	10.8	11.9	13.0	14.1	15.2	16.3	17.4	18.5	19.6	20.7	21.8	22.9	24.1	25.2	26.3	27.4	28.6	29.7	30.8	32.0	33.1	34.3	35.4
9	9.8	10.9	12.0	13.1	14.2	15.3	16.4	17.6	18.7	19.8	20.9	22.0	23.2	24.3	25.4	26.6	27.7	28.9	30.0	31.2	32.3	33.5	34.6	35.8	37.0
10	11.0	12.1	13.2	14.4	15.5	16.6	17.7	18.9	20.0	21.1	22.3	23.4	24.6	25.7	26.9	28.0	29.2	30.3	31.5	32.7	33.8	35.0	36.2	37.4	38.6
11	12.2	13.4	14.5	15.6	16.8	17.9	19.1	20.2	21.4	22.5	23.7	24.8	26.0	27.2	28.3	29.5	30.7	31.9	33.0	34.2	35.4	36.6	37.8	39.0	40.2
12	13.5	14.6	15.8	16.9	18.1	19.3	20.4	21.6	22.8	23.9	25.1	26.3	27.5	28.6	29.8	31.0	32.2	33.4	34.6	35.8	37.0	38.2	39.5	40.7	41.9
13	14.8	16.0	17.1	18.3	19.5	20.6	21.8	23.0	24.2	25.4	26.6	27.8	29.0	30.2	31.4	32.6	33.8	35.0	36.2	37.5	38.7	39.9	41.2	42.4	43.6
14	16.1	17.3	18.5	19.7	20.9	22.1	23.3	24.5	25.7	26.9	28.1	29.3	30.5	31.7	33.0	34.2	35.4	36.7	37.9	39.1	40.4	41.6	42.9	44.2	45.4
15	17.5	18.7	19.9	21.1	22.3	23.5	24.7	25.9	27.2	28.4	29.6	30.9	32.1	33.3	34.6	35.8	37.1	38.4	39.6	40.9	42.2	43.4	44.7	46.0	47.3
16	18.9	20.1	21.3	22.6	23.8	25.0	26.2	27.5	28.7	30.0	31.2	32.5	33.7	35.0	36.3	37.5	38.8	40.1	41.4	42.7	44.0	45.3	46.6	47.9	49.2
17	20.3	21.6	22.8	24.1	25.3	26.6	27.8	29.1	30.3	31.6	32.9	34.1	35.4	36.7	38.0	39.3	40.6	41.9	43.2	44.5	45.9	47.2	48.5	49.8	51.2
18	21.8	23.1	24.3	25.6	26.9	28.1	29.4	30.7	32.0	33.3	34.6	35.9	37.2	38.5	39.8	41.1	42.4	43.8	45.1	46.5	47.8	49.2	50.5	51.9	53.2
19	23.3	24.6	25.9	27.2	28.5	29.8	31.1	32.4	33.7	35.0	36.3	37.6	39.0	40.3	41.6	43.0	44.3	45.7	47.1	48.4	49.8	51.2	52.6	54.0	55.4
20	24.9	26.2	27.5	28.8	30.1	31.5	32.8	34.1	35.4	36.8	38.1	39.5	40.8	42.2	43.6	44.9	46.3	47.7	49.1	50.5	51.9	53.3	54.7	56.1	57.6
21	26.5	27.9	29.2	30.5	31.8	33.2	34.5	35.9	37.3	38.6	40.0	41.4	42.8	44.1	45.5	46.9	48.4	49.8	51.2	52.6	54.1	55.5	56.9	58.4	59.9
22	28.2	29.5	30.9	32.3	33.6	35.0	36.4	37.7	39.1	40.5	41.9	43.3	44.8	46.2	47.6	49.0	50.5	51.9	53.4	54.8	56.3	57.8	59.3	60.8	62.3
23	29.9	31.3	32.7	34.1	35.5	36.8	38.3	39.7	41.1	42.5	43.9	45.4	46.8	48.3	49.7	51.2	52.7	54.2	55.6	57.1	58.6	60.2	61.7	63.2	64.7
24	31.7	33.1	34.5	35.9	37.3	38.8	40.2	41.7	43.1	44.6	46.0	47.5	49.0	50.5	52.0	53.5	55.0	56.5	58.0	59.5	61.1	62.6	64.2	65.8	67.3
25	33.6	35.0	36.4	37.9	39.3	40.8	42.2	43.7	45.2	46.7	48.2	49.7	51.2	52.7	54.3	55.8	57.3	58.9	60.5	62.0	63.6	65.2	66.8	68.4	70.0
26	35.5	36.9	38.4	39.9	41.4	42.8	44.3	45.9	47.4	48.9	50.4	52.0	53.5	55.1	56.7	58.2	59.8	61.4	63.0	64.7	66.3	67.9	69.6	71.2	72.9
27	37.4	38.9	40.4	42.0	43.5	45.0	46.5	48.1	49.6	51.2	52.8	54.4	56.0	57.6	59.2	60.8	62.4	64.1	65.7	67.4	69.1	70.8	72.5	74.2	75.9
28	39.5	41.0	42.6	44.1	45.7	47.3	48.8	50.4	52.0	53.6	55.2	56.9	58.5	60.2	61.8	63.5	65.2	66.9	68.6	70.3	72.0	73.7	75.5	77.3	79.0
29	41.7	43.2	44.8	46.4	48.0	49.6	51.2	52.8	54.5	56.1	57.8	59.5	61.2	62.9	64.6	66.3	68.0	69.8	71.5	73.3	75.1	76.9	78.7	80.5	82.4
30	43.9	45.5	47.1	48.7	50.4	52.0	53.7	55.4	57.1	58.8	60.5	62.2	64.0	65.7	67.5	69.3	71.0	72.9	74.7	76.5	78.3	80.2	82.1	84.0	85.9
31	46.2	47.9	49.5	51.2	52.9	54.6	56.3	58.1	59.8	61.6	63.3	65.1	66.9	68.7	70.5	72.4	74.2	76.1	78.0	79.9	81.8	83.7	85.7	87.6	89.6
32	48.7	50.4	52.1	53.8	55.6	57.3	59.1	60.9	62.7	64.5	66.3	68.2	70.0	71.9	73.8	75.7	77.6	79.5	81.5	83.5	85.4	87.5	89.5	91.5	93.6
33	51.2	53.0	54.8	56.5	58.3	60.2	62.0	63.8	65.7	67.6	69.5	71.4	73.3	75.2	77.2	79.2	81.2	83.2	85.2	87.3	89.3	91.4	93.6	95.7	97.8
34	53.9	55.7	57.6	59.4	61.3	63.1	65.0	67.0	68.9	70.8	72.8	74.8	76.8	78.8	80.8	82.9	85.0	87.1	89.2	91.4	93.5	95.7	97.9	100.2	102.4
35	56.8	58.6	60.5	62.4	64.4	66.3	68.3	70.3	72.3	74.3	76.3	78.4	80.5	82.6	84.7	86.9	89.1	91.3	93.5	95.7	98.0	100.3	102.6	105.0	107.3
36	59.8	61.7	63.7	65.7	67.7	69.7	71.7	73.8	75.9	78.0	80.1	82.3	84.5	86.7	88.9	91.2	93.5	95.8	98.1	100.5	102.9	105.3	107.7	110.2	112.7
37	62.9	65.0	67.0	69.1	71.2	73.3	75.4	77.6	79.8	82.0	84.2	86.5	88.8	91.1	93.4	95.8	98.2	100.6	103.1	105.6	108.1	110.7	113.3	115.9	118.6
38	66.3	68.4	70.6	72.7	74.9	77.1	79.4	81.6	83.9	86.2	88.6	91.0	93.4	95.8	98.3	100.8	103.4	105.9	108.6	111.2	113.9	116.6	119.4	122.2	125.0
39	70.0	72.2	74.4	76.7	78.9	81.3	83.6	86.0	88.4	90.9	93.4	95.9	98.4	101.0	103.6	106.3	109.0	111.8	114.6	117.4	120.3	123.2	126.1	129.2	132.2
40	73.8	76.2	78.5	80.9	83.3	85.7	88.2	90.8	93.3	95.9	98.5	101.2	103.9	106.7	109.5	112.4	115.3	118.2	121.2	124.3	127.4	130.5	133.7	137.0	140.3
41	78.0	80.5	83.0	85.5	88.0	90.6	93.3	95.9	98.7	101.4	104.3	107.1	110.0	113.0	116.0	119.1	122.2	125.4	128.7	132.0	135.4	138.8	142.3	145.9	149.5
42	82.6	85.2	87.8	90.5	93.2	96.0	98.8	101.7	104.6	107.6	110.6	113.7	116.9	120.1	123.4	126.7	130.1	133.6	137.2	140.8	144.5	148.3	152.2	156.1	160.2
43	87.6	90.4	93.2	96.0	99.0	101.9	105.0	108.1	111.2	114.5	117.8	121.1	124.6	128.1	131.7	135.4	139.1	143.0	147.0	151.0	155.2	159.4	163.8	168.2	172.8
44	93.1	96.1	99.1	102.2	105.4																				

Tabla E.2 de NMP (Continuación).

No. Large Wells positive	No. Small Wells Positive																							
	25	26	27	8	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
0	25.3	26.4	27.4	28.4	29.5	30.5	31.5	32.6	33.6	34.7	35.7	36.8	37.8	38.9	40.0	41.0	42.1	43.1	44.2	45.3	46.3	47.4	48.5	49.5
1	26.6	27.7	28.7	29.8	30.8	31.9	32.9	34.0	35.0	36.1	37.2	38.2	39.3	40.4	41.4	42.5	43.6	44.7	45.7	46.8	47.9	49.0	50.1	51.2
2	27.9	29.0	30.0	31.1	32.2	33.2	34.3	35.4	36.5	37.5	38.6	39.7	40.8	41.9	43.0	44.0	45.1	46.2	47.3	48.4	49.5	50.6	51.7	52.8
3	29.3	30.4	31.4	32.5	33.6	34.7	35.8	36.8	37.9	39.0	40.1	41.2	42.3	43.4	44.5	45.6	46.7	47.8	48.9	50.0	51.2	52.3	53.4	54.5
4	30.7	31.8	32.8	33.9	35.0	36.1	37.2	38.3	39.4	40.5	41.6	42.8	43.9	45.0	46.1	47.2	48.3	49.5	50.6	51.7	52.9	54.0	55.1	56.3
5	32.1	33.2	34.3	35.4	36.5	37.6	38.7	39.9	41.0	42.1	43.2	44.4	45.5	46.6	47.7	48.9	50.0	51.2	52.3	53.5	54.6	55.8	56.9	58.1
6	33.5	34.7	35.8	36.9	38.0	39.2	40.3	41.4	42.6	43.7	44.8	46.0	47.1	48.3	49.4	50.6	51.7	52.9	54.1	55.2	56.4	57.6	58.7	59.9
7	35.0	36.2	37.3	38.4	39.6	40.7	41.9	43.0	44.2	45.3	46.5	47.7	48.8	50.0	51.2	52.3	53.5	54.7	55.9	57.1	58.3	59.4	60.6	61.8
8	36.6	37.7	38.9	40.0	41.2	42.3	43.5	44.7	45.9	47.0	48.2	49.4	50.6	51.8	53.0	54.1	55.3	56.5	57.7	59.0	60.2	61.4	62.6	63.8
9	38.1	39.3	40.5	41.6	42.8	44.0	45.2	46.4	47.6	48.8	50.0	51.2	52.4	53.6	54.8	56.0	57.2	58.4	59.7	60.9	62.1	63.4	64.6	65.8
10	39.7	40.9	42.1	43.3	44.5	45.7	46.9	48.1	49.3	50.6	51.8	53.0	54.2	55.5	56.7	57.9	59.2	60.4	61.7	62.9	64.2	65.4	66.7	67.9
11	41.4	42.6	43.8	45.0	46.3	47.5	48.7	49.9	51.2	52.4	53.7	54.9	56.1	57.4	58.6	59.9	61.2	62.4	63.7	65.0	66.3	67.5	68.8	70.1
12	43.1	44.3	45.6	46.8	48.1	49.3	50.6	51.8	53.1	54.3	55.6	56.8	58.1	59.4	60.7	62.0	63.2	64.5	65.8	67.1	68.4	69.7	71.0	72.4
13	44.9	46.1	47.4	48.6	49.9	51.2	52.5	53.7	55.0	56.3	57.6	58.9	60.2	61.5	62.8	64.1	65.4	66.7	68.0	69.3	70.7	72.0	73.3	74.7
14	46.7	48.0	49.3	50.5	51.8	53.1	54.4	55.7	57.0	58.3	59.6	60.9	62.3	63.6	64.9	66.3	67.6	68.9	70.3	71.6	73.0	74.4	75.7	77.1
15	48.6	49.9	51.2	52.5	53.8	55.1	56.4	57.8	59.1	60.4	61.8	63.1	64.5	65.8	67.2	68.5	69.9	71.3	72.6	74.0	75.4	76.8	78.2	79.6
16	50.5	51.8	53.2	54.5	55.8	57.2	58.5	59.9	61.2	62.6	64.0	65.3	66.7	68.1	69.5	70.9	72.3	73.7	75.1	76.5	77.9	79.3	80.8	82.2
17	52.5	53.9	55.2	56.6	58.0	59.3	60.7	62.1	63.5	64.9	66.3	67.7	69.1	70.5	71.9	73.3	74.8	76.2	77.6	79.1	80.5	82.0	83.5	84.9
18	54.6	56.0	57.4	58.8	60.2	61.6	63.0	64.4	65.8	67.2	68.6	70.1	71.5	73.0	74.4	75.9	77.3	78.8	80.3	81.8	83.3	84.8	86.3	87.8
19	56.8	58.2	59.6	61.0	62.4	63.9	65.3	66.8	68.2	69.7	71.1	72.6	74.1	75.5	77.0	78.5	80.0	81.5	83.1	84.6	86.1	87.6	89.2	90.7
20	59.0	60.4	61.9	63.3	64.8	66.3	67.7	69.2	70.7	72.2	73.7	75.2	76.7	78.2	79.8	81.3	82.8	84.4	85.9	87.5	89.1	90.7	92.2	93.8
21	61.3	62.8	64.3	65.8	67.3	68.8	70.3	71.8	73.3	74.9	76.4	77.9	79.5	81.1	82.6	84.2	85.8	87.4	89.0	90.6	92.2	93.8	95.4	97.1
22	63.8	65.3	66.8	68.3	69.8	71.4	72.9	74.5	76.1	77.6	79.2	80.8	82.4	84.0	85.6	87.2	88.9	90.5	92.1	93.8	95.5	97.1	98.8	100.5
23	66.3	67.8	69.4	71.0	72.5	74.1	75.7	77.3	78.9	80.5	82.2	83.8	85.4	87.1	88.7	90.4	92.1	93.8	95.5	97.2	98.9	100.6	102.4	104.1
24	68.9	70.5	72.1	73.7	75.3	77.0	78.6	80.3	81.9	83.6	85.2	86.9	88.6	90.3	92.0	93.8	95.5	97.2	99.0	100.7	102.5	104.3	106.1	107.9
25	71.7	73.3	75.0	76.6	78.3	80.0	81.7	83.3	85.1	86.8	88.5	90.2	92.0	93.7	95.5	97.3	99.1	100.9	102.7	104.5	106.3	108.2	110.0	111.9
26	74.6	76.3	78.0	79.7	81.4	83.1	84.8	86.6	88.4	90.1	91.9	93.7	95.5	97.3	99.2	101.0	102.9	104.7	106.6	108.5	110.4	112.3	114.2	116.2
27	77.6	79.4	81.1	82.9	84.6	86.4	88.2	90.0	91.9	93.7	95.5	97.4	99.3	101.2	103.1	105.0	106.9	108.8	110.8	112.7	114.7	116.7	118.7	120.7
28	80.8	82.6	84.4	86.3	88.1	89.9	91.8	93.7	95.6	97.5	99.4	101.3	103.3	105.2	107.2	109.2	111.2	113.2	115.2	117.3	119.3	121.4	123.5	125.6
29	84.2	86.1	87.9	89.8	91.7	93.7	95.6	97.5	99.5	101.5	103.5	105.5	107.5	109.5	111.6	113.7	115.7	117.8	120.0	122.1	124.2	126.4	128.6	130.8
30	87.8	89.7	91.7	93.6	95.6	97.6	99.6	101.6	103.7	105.7	107.8	109.9	112.0	114.2	116.3	118.5	120.6	122.8	125.1	127.3	129.5	131.8	134.1	136.4
31	91.6	93.6	95.6	97.7	99.7	101.8	103.9	106.0	108.2	110.3	112.5	114.7	116.9	119.1	121.4	123.6	125.9	128.2	130.5	132.9	135.3	137.7	140.1	142.5
32	95.7	97.8	99.9	102.0	104.2	106.3	108.5	110.7	113.0	115.2	117.5	119.8	122.1	124.5	126.8	129.2	131.6	134.0	136.5	139.0	141.5	144.0	146.6	149.1
33	100.0	102.2	104.4	106.6	108.9	111.2	113.5	115.8	118.2	120.5	122.9	125.4	127.8	130.3	132.8	135.3	137.8	140.4	143.0	145.6	148.3	150.9	153.7	156.4
34	104.7	107.0	109.3	111.7	114.0	116.4	118.9	121.3	123.8	126.3	128.8	131.4	134.0	136.6	139.2	141.9	144.6	147.4	150.1	152.9	155.7	158.6	161.5	164.4
35	109.7	112.2	114.6	117.1	119.6	122.2	124.7	127.3	129.9	132.6	135.3	138.0	140.8	143.6	146.4	149.2	152.1	155.0	158.0	161.0	164.0	167.1	170.2	173.3
36	115.2	117.8	120.4	123.0	125.7	128.4	131.1	133.9	136.7	139.5	142.4	145.3	148.3	151.3	154.3	157.3	160.5	163.6	166.8	170.0	173.3	176.6	179.9	183.3
37	121.3	124.0	126.8	129.6	132.4	135.3	138.2	141.2	144.2	147.3	150.3	153.5	156.7	159.9	163.1	166.5	169.8	173.2	176.7	180.2	183.7	187.3	191.0	194.7
38	127.9	130.8	133.8	136.8	139.9	143.0	146.2	149.4	152.6	155.9	159.2	162.6	166.1	169.6	173.2	176.8	180.4	184.2	188.0	191.8	195.7	199.7	203.7	207.7
39	135.3	138.5	141.7	145.0	148.3	151.7	155.1	158.6	162.1	165.7	169.4	173.1	176.9	180.7	184.7	188.7	192.7	196.8	201.0	205.3	209.6	214.0	218.5	223.0
40	143.7	147.1	150.6	154.2	157.8	161.5	165.3	169.1	173.0	177.0	181.1	185.2	189.4	193.7	198.1	202.5	207.1	211.7	216.4	221.1	226.0	231.0	236.0	241.1
41	153.2	157.0	160.9	164.8	168.9	173.0	177.2	181.5	185.8	190.3	194.8	199.5	204.2	209.1	214.0	219.1	224.2	229.4	234.8	240.2	245.8	251.5	257.2	263.1
42	164.3	168.6	172.9	177.3	181.9	186.5	191.3	196.1	201.1	206.2	211.4	216.7	222.2	227.7	233.4	239.2	245.2	251.3	257.5	263.8	270.3	276.9	283.6	290.5
43	177.5	182.3	187.3	192.4	197.6	202.9	208.4	214.0	219.8	225.8	231.8	238.1	244.5	251.0	257.7	264.6	271.7	278.9	286.3	293.8	301.5	309.4	317.4	325.7
44	193.6	199.3	205.1	211.0	217.2	223.5	230.0	236.7	243															

E.4.5 Interpretación de resultados.

Si se observa fluorescencia en los frascos, tubos o charolas, se confirma entonces la presencia de Enterococos.

E.4.6 Criterios de validez de la prueba.

E.4.6.1 Deberá llevarse a cabo un control de calidad en cada nuevo lote de reactivo, el cual consiste del siguiente protocolo:

E.4.6.1.1 Para cada tipo de cepa ATCC enlistadas más adelante, estriar en AST o a placas de agar sangre e incubar a 35°C por 18h a 24h ± 2h.

E.4.6.1.2 De cada cepa bacteriana, tomar 1 colonia e inocular un tubo de ensayo con 5mL de agua deionizada estéril. Cerrar y agitar completamente.

E.4.6.1.3 A continuación tomar una asada de 1µL (microlitros) del tubo de ensayo y usar para inocular un frasco con 100mL de agua deionizada o destilada estéril, debidamente etiquetado. Seguir los pasos del inciso E.4.2 de presencia/ausencia, señalados anteriormente.

E.4.6.1.4 Comparar los resultados de esta prueba con los resultados esperados de la siguiente tabla:

Control	ATCC	Resultados esperados
<i>E. faecium</i>	700221 o 35667	Fluorescencia
<i>Serratia marcescens</i> (Gram -)	43862	No fluorescencia
<i>Aerococcus viridians</i> (Gram +)	10400	No fluorescencia

E.4.7 Informe de prueba.

Informar como presencia, ausencia o el resultado basado en el cálculo de la densidad de enterococos determinado en la Tabla de NMP E.1 y E.2.

E.5 MEDIOS DE CULTIVO.

E.5.1 Medio que contiene el sustrato fluorogénico definido (comercialmente disponible).

Apéndice F Normativo.**Método para la determinación de Enterococos fecales en agua técnica de filtración por membrana.****F.1 INTRODUCCIÓN.**

El recuento de enterococos intestinales se basa en la filtración de un volumen determinado de una muestra de agua, a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro suficiente para retener las bacterias (0.45µm). La membrana es colocada en un medio selectivo sólido que contiene azida de sodio, la cual inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas. El cloruro de 2, 3, 5 – trifeniltetrazolio es un compuesto incoloro, que por la acción de los enterococos intestinales, se reduce a formazán de color rojo.

Las colonias típicas de enterococos intestinales, son elevadas de color rojo, marrón o rosa.

Confirmación: si se observan colonias típicas, la prueba de confirmación es necesaria y la membrana se transfiere a una caja con ABEA (medios solidificados). Los enterococos intestinales hidrolizan la esculina, dando como producto final la 6, 7-dihidroximarina, que al combinarse con los iones Fe^{3+} , forman un compuesto colorido que va desde marrón a negro que se difunde en el agar.

F.2 MEDIOS DE CULTIVO.

PRECAUCIÓN. La azida de sodio es un polvo fino altamente tóxico y mutagénico. Durante su preparación, deben emplearse guantes, cubrebocas especiales para polvos, lentes de protección y lavarse las manos inmediatamente después de su preparación.

Los medios que contienen azida no deben mezclarse con ácidos minerales fuertes, ya que puede producirse azida de hidrógeno que es tóxica. Las soluciones que contienen azida pueden formar también compuestos explosivos por contacto con tuberías metálicas, por ejemplo, en los desagües.

Las azidas pueden descomponerse de forma segura, por adición de un exceso de solución saturada de nitrito.

F.3 MATERIALES.

F.3.1 Botellas de dilución de vidrio de boro silicato o frascos de poli-propileno;

F.3.2 Pipetas serológicas de 10mL;

F.3.3 Pipetas serológicas de 1mL;

F.3.4 Pinzas estériles para membrana;

F.3.5 Matraces Kitazato de 1000mL;

F.3.6 Filtros de membranas estériles de tamaño de poro de 0.45µm;

F.3.7 Cajas Petri de vidrio de borosilicato o plástico estériles de 60mm x 15mm o 50mm x 9mm u otro tamaño apropiado;

F.3.8 Propipeta, y

F.3.9 Manguera de hule para equipo de filtración.

F.4 APARATOS E INSTRUMENTOS.

F.4.1 Autoclave, capaz de mantener una temperatura de 121°C ± 1°C con termómetro calibrado y/o verificado;

F.4.2 Potenciómetro con sensibilidad de 0.1 de unidad de pH;

F.4.3 Equipo de filtración con trampa;

F.4.4 Bomba de vacío;

F.4.5 Cuenta colonias, y

F.4.6 Incubadora, capaz de mantener una temperatura de 35°C ± 0.5°C con termómetro verificado y/o calibrado.

F.5 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.

F.5.1 Filtración e incubación: Conectar el equipo de filtración a la bomba de vacío. Utilizando pinzas estériles, colocar la membrana con la cuadrícula hacia arriba sobre el portafiltro. Colocar cuidadosamente el embudo sobre el receptáculo y asegurarlo en su lugar. Abrir la llave de paso y filtrar a través de la membrana, 100mL de muestra aplicando suficiente vacío (aproximadamente 70kPa (kilo pascal). Cerrar la llave de paso tan pronto como la muestra haya sido filtrada. Es aconsejable enjuagar el embudo mediante la filtración de 1 a 3 porciones de 10mL a 30mL de diluyente estéril, mientras la membrana permanezca en su lugar. Inmediatamente después cerrar la llave de paso. Retirar el embudo para dejar expuesta la membrana de filtración. Colocar la membrana con pinzas estériles en el agar Slanetz & Bartley. Evitar la formación de burbujas entre la membrana y la superficie del agar. Dejar 30 min y posteriormente incubar las placas invertidas a 35°C ± 0.5°C durante 48h ± 4h.

F.5.2 Confirmación y Recuento. Las colonias típicas de enterococos son elevadas, de color rojo, marrón o rosado. Si hay colonias típicas, transferir la membrana con pinzas estériles a una placa con ABE. Incubar a 35°C ± 0.5°C durante 48h ± 4h. Leer la placa inmediatamente después de la incubación. Las colonias típicas de enterococos intestinales presentan un color marrón a negro alrededor de la colonia. Con ayuda de un cuenta colonias, seleccionar cajas que contengan entre 20 y 60 colonias típicas y contar el número de UFC.

Nota: Una distribución desigual de las colonias o la presencia de microbiota competitiva, puede interferir con la diferenciación de colonias positivas debido a la difusión del color a las colonias adyacentes.

F.6 Cálculos.

Aplicar la siguiente fórmula para determinar la cantidad de enterococos:

Fórmula 1:

$$C_s = \frac{Z}{V_{tot}} \times V_s$$

Donde:

C_s es el número estimado de UFC en un volumen de referencia de la muestra (100mL)

Z es la suma de colonias contadas en las membranas provenientes de diferentes diluciones $d_1, d_2, \dots, d_i$ o de volúmenes separados de muestras filtradas.

V_s el volumen de referencia seleccionado para expresar la concentración de enterococos en la muestra.

V_{tot} es la suma del volumen total de las porciones probadas de muestra o dilución.

Fórmula 2:

$$V_{\text{tot}} = (n_1 V_1 d_1) + (n_2 V_2 d_2) + \dots (n_i V_i d_i)$$

Donde:

$n_1, n_2, \dots, n_i$ es el número de membranas filtradas por dilución $d_1, d_2, \dots, d_i$

$V_1, V_2, \dots, V_i$ es el volumen analizado en la dilución $d_1, d_2, \dots, d_i$ o porción de muestra

$d_1, d_2, \dots, d_i$ es la dilución utilizada por cada porción de volumen analizado V_1, V_2, V_i ($d = 1$ para la muestra sin diluir, $d = 0.1$ para una dilución 1:10, etc.)

Ejemplo:

Volumen probado	Cuentas
100mL	82 colonias
10mL	11 colonias

$$Z = 82 + 11 = 93$$

$$V_{\text{tot}} = (1 \times 100 \times 1) + (1 \times 10 \times 1) = 110$$

y si V_s es por 100mL:

$$C_s = \frac{93}{110} \times 100 = 84 \text{ UFC/100mL}$$

$$110$$

F.6.1 Interpretación de resultados.

La presencia de colonias color marrón a negro alrededor de la colonia en ABE, incubado a $35^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ durante $48\text{h} \pm 4\text{h}$, se considera una prueba confirmativa de la presencia del género *Enterococcus*.

F.6.2 Criterios de validez de la prueba.

Esta prueba tiene validez si se obtienen cajas que contengan entre 20 a 60 UFC.

Una distribución desigual de las colonias o la presencia de microbiota competitiva, puede interferir con la diferenciación de colonias positivas debido a la difusión del color a las colonias adyacentes.

F.7 Informe de prueba.

F.7.1 Informar como: Enterococos intestinales UFC/100mL.

F.7.2 Si se observan menos de 20 colonias, aplicar la fórmula 1 e informar como valor estimado.

F.7.3 Placas sin colonias, informar como $< 1/V_{\text{tot}}$ UFC/100mL e informar como valor estimado.

Donde: V_{tot} es la suma del volumen total de las porciones probadas de muestra o dilución (ver inciso F.6).

También se puede informar como "Cero" u "organismos no detectables" indicando el volumen de muestra analizada.

F.7.4 En caso que se tengan placas con más de 60 colonias, informar como $>$ de 60 UFC/100mL.

F.8 MEDIOS DE CULTIVO.**F.8.1 Medio Slanetz y Bartley. (Agar mEnterococos)****F.8.1.1 Medio base.**

Ingredientes	Cantidad
Triptosa	20,0g
Extracto de Levadura	5,0g
Glucosa	2,0g
Fosfato dipotásico, K_2HPO_4	4,0g
Azida de Sodio NaN_3	0.4g
Agar	8g a 18g* (* La cantidad de agar depende de la gelificación del agar)
Agua	1L

Disolver los ingredientes en 1L de agua hirviendo. Calentar durante 5 min más. Enfriar entre 50°C y 60°C .

F.8.1.2 Solución de TTC 0.1%.

Ingredientes	Cantidad
Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio TTC	1.0g
Agua	100mL

Disolver el indicador en 100mL de agua, agitando constantemente. Esterilizar por filtración (0,2µm de poro). Proteger la solución de la luz. Descartar cuando aparezca una coloración rosa.

F.8.1.3 Medio Completo.

Ingredientes	Cantidad
Medio Base	1L
Solución de TTC	10mL

Adicionar la solución de TTC sobre el medio base enfriado a una temperatura de 50°C a 60°C. El pH después de la esterilización debe ser de 7.2 ± 0.1 a 25°C. Distribuir en placas de Petri. Dejar solidificar sobre una superficie horizontal fría. Conservar en la oscuridad por 2 semanas a $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$.

F.8.2 ABE.

Ingredientes	Cantidad
Extracto de Carne	3.0g
Peptona	5.0g
Bilis de buey deshidratada	40.0g
Esculina	1.0g
Citrato Férrico	0.5g
Agar	de 8g a 18g* (* Dependiendo de la gelificación del agar)
Agua	1L

Calentar para disolver los ingredientes. Esterilizar a $121^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durante 15 min. No sobrecalentar. El pH después de la esterilización debe ser de 6.6 ± 0.2 . Distribuir en placas Petri para obtener un espesor de 3mm a 5mm. Dejar solidificar en una superficie horizontal. Almacenar de 2°C a 10°C .

Apéndice G Normativo.

Método aprobado para el monitoreo de Enterococos fecales recomendado para el monitoreo de aguas para uso recreativo.

G.1 INTRODUCCIÓN.

Se basa en la filtración de un volumen determinado de una muestra de agua, a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro suficiente para retener las bacterias (0.45µm). La membrana es colocada en agar mEI el cual contiene entre otros ingredientes, el cromógeno indoxilβ D- glucosido, que debido a la acción de la enzima β-Dglucosidasa sintetizada por los enterococos, producen un compuesto azul índigo alrededor de la colonia que se difunde.

G.2 MATERIALES.

G.2.1 Botellas de dilución de vidrio de boro silicato o frascos de poli-propileno;

G.2.2 Pipetas serológicas de 10mL;

G.2.3 Pipetas serológicas de 1mL;

G.2.4 Pinzas estériles para membrana;

G.2.5 Matraces Kitazato de 1000mL;

G.2.6 Filtros de membranas estériles de tamaño de poro de 0.45µm;

G.2.7 Cajas Petri de vidrio de borosilicato o plástico estériles de 60mm x 15mm o 50mm x 9mm u otro tamaño apropiado;

G.2.8 Propipeta, y

G.2.9 Manguera de hule para equipo de filtración.

G.3 APARATOS E INSTRUMENTOS.

G.3.1 Potenciómetro con sensibilidad de 0.1 de unidad de pH;

G.3.2 Equipo de filtración con trampa;

G.3.3 Bomba de vacío;

G.3.4 Cuenta colonias;

G.3.5 Incubadora, capaz de mantener una temperatura de $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ con termómetro verificado y/o calibrado, y

G.3.6 Incubadora, capaz de mantener una temperatura de $45^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ con termómetro verificado y/o calibrado.

G.4 MEDIOS DE CULTIVO.

G.4.1 BHI;

G.4.2 BHI con 6.5% NaCl;

G.4.3 Agar infusión cerebro corazón;

G.4.4 ABE, y

G.4.5 Agar mEI.

G.5 PROCEDIMIENTO.

G.5.1 Consultar el inciso F.5.1 y colocar la membrana en la superficie del agar mEI e incubar a $41^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 24h. Seleccionar cajas que contengan entre 20 y 80 colonias que independientemente de su color tengan un halo azul correspondiente a enterococos. Las colonias con halo azul se pueden verificar.

G.5.2 La verificación de las colonias puede ser necesaria para evidenciar cúmulos y también para control de calidad al implementar la prueba, cambios en los sitios de muestreo, lotes de medio comercial o preparado por ingredientes. Transferir al menos 10 colonias típicas aisladas a caldo BHI y agar infusión cerebro corazón inclinado. Incubar los caldos y los agares por 48h a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Después de 24h de incubación transferir una asada de los tubos de BHI a ABE y a BHI y BHI con 6.5% de NaCl.

G.5.2.1 Incubar el ABE y el BHI con 6.5% de NaCl a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 48h.

G.5.2.2 Incubar el caldo BHI a $45^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 48h.

G.5.3 Observar crecimiento.

G.5.3.1 Después de las 48h de incubación, hacer una tinción de Gram al crecimiento de los agares de BHI.

G.5.3.2 Los cocos Gram positivos que crecen e hidrolizan la esculina en ABE (producción de un precipitado negro o café) y crecen en caldo BHI a $45^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y caldo BHI con 6.5% de NaCl a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ son confirmados como enterococos.

G.6 Cálculos.

Aplicar la siguiente fórmula para determinar la cantidad de enterococos:

Fórmula 1:

$$C_s = \frac{Z}{V_{\text{tot}}} \times V_s$$

Donde:

C_s es el número estimado de UFC en un volumen de referencia de la muestra (100mL)

Z es la suma de colonias contadas en las membranas provenientes de diferentes diluciones $d_1, d_2 \dots d_i$ o de volúmenes separados de muestras filtradas.

V_s el volumen de referencia seleccionado para expresar la concentración de enterococos en la muestra.

V_{tot} es la suma del volumen total de las porciones probadas de muestra o dilución.

Fórmula 2:

$$V_{\text{tot}} = (n_1 V_1 d_1) + (n_2 V_2 d_2) + \dots (n_i V_i d_i)$$

Donde:

$n_1, n_2, \dots, n_i$ es el número de membranas filtradas por dilución $d_1, d_2, \dots, d_i$

$V_1, V_2, \dots, V_i$ es el volumen analizado en la dilución $d_1, d_2, \dots, d_i$ o porción de muestra

$d_1, d_2, \dots, d_i$ es la dilución utilizada por cada porción de volumen analizado $V_1, V_2, \dots, V_i$ ($d = 1$ para la muestra sin diluir, $d = 0.1$ para una dilución 1:10, etc.).

Ejemplo:

Volumen probado	Cuentas
100mL	82 colonias
10mL	11 colonias

$$Z = 82 + 11 = 93$$

$$V_{\text{tot}} = (1 \times 100 \times 1) + (1 \times 10 \times 1) = 110$$

y si V_s es por 100mL:

$$C_s = \frac{93}{110} \times 100 = 84 \text{ UFC/100mL}$$

G.6.1 Interpretación de resultados.

La presencia de colonias que independientemente de su color presenten un halo azul en agar mEI, incubado a $41^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ por 24h, se considera una prueba confirmativa de enterococos.

G.6.2 Criterios de validez de la prueba.

Esta prueba tiene validez si se obtienen cajas que contengan entre 20 a 80 UFC.

Una distribución desigual de las colonias o la presencia de microbiota competitiva, puede interferir con la diferenciación de colonias positivas debido a la difusión del color a las colonias adyacentes.

G.6.3 Informe de prueba.

Informar como: Enterococos intestinales UFC/100mL.

Si se observan menos de 20 colonias, aplicar la fórmula 1 e informar como valor estimado.

Placas sin colonias, informar como $< 1/V_{\text{tot}}$ UFC/100mL e informar como valor estimado.

Donde: V_{tot} es la suma del volumen total de las porciones probadas de muestra o dilución.

También se puede informar como "Cero" u "organismos no detectables" indicando el volumen de muestra analizada.

En caso que se tengan placas con más de 80 colonias, informar como > 80 UFC/100mL.

G.7 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.**G.7.1 BHI.****G.7.1.1 Fórmula.**

Infusión de cerebro de ternera a partir de 200.0g	7.7g
Infusión de corazón de res a partir de 250.0g	9.8g
Proteosa peptona	10.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Fosfato disódico	2.5g
Dextrosa	2.0g
Agua destilada	1.0L

G.7.1.2 Preparación: Disolver los ingredientes o 37.0g del medio deshidratado en un matraz con 1L de agua destilada, distribuir volúmenes de 10mL en tubos de ensaye con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min. El pH final del medio deberá ser de 7.4 ± 0.2 .

G.7.2 BHI con 6.5% de NaCl.

G.7.2.1 Fórmula: BHI con 6.5% de NaCl seguir las instrucciones que en BHI antes descrito, pero agregando NaCl.

G.7.2.2 Preparación: Agregar 60.0g de NaCl por cada L de medio. Dado que la presentación comercial deshidratada contiene 5g de NaCl, esta cantidad deberá restarse de los 65g necesarios por L para obtener una concentración final de 6.5% de NaCl.

G.7.3 Agar infusión cerebro corazón.

G.7.3.1 Fórmula: El agar BHI contiene los mismos ingredientes que el BHI pero adicionando 5.0g de agar por cada L de medio.

G.7.3.2 Preparación: Suspender los ingredientes o 52g del medio agar BHI deshidratado en 1L de agua destilada. Calentar a ebullición hasta disolver los ingredientes. Distribuir 10mL del medio en tubos con tapón de rosca y esterilizar a 121°C por 15 min. Después de la esterilización, solidificar inclinado, pH final 7.4 ± 0.2 .

G.7.4 ABE.**G.7.4.1 Fórmula.**

Extracto de carne	3.0g
Peptona	5.0g
Sales biliares	40.0g
Esculina	1.0L
Citrato férrico	0.5g
Agar	15.0g
Agua destilada	1.0L

G.7.4.2 Preparación: Disolver los ingredientes o 64.0g del medio deshidratado en un 1L de agua destilada, calentar a ebullición hasta la disolución de los ingredientes.

Distribuir volúmenes de 10mL a tubos con tapón de rosca o frascos. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min, Después de esterilizar, solidificar los tubos inclinados o dejar enfriar a 50°C en baño de agua y distribuir en cajas Petri, dejar solidificar. El pH final del medio es 6.6 ± 0.2 . Almacenar en refrigeración.

G.7.5 Agar mEI.**G.7.5.1 Fórmula.**

Peptona	10.0g
Cloruro de sodio	15.0g
Extracto de levadura	30.0g
Esculina	1.0g
Actidiona (Cicloheximida)	0.05g
Azida de sodio	0.15g
Agar	15.0g
Agua destilada	1.0L

G.7.5.2 Preparación: Agregar a un matraz, los ingredientes o 71.2g del medio comercial deshidratado más 0.75g de indoxyl- β -D-glucósido a 1L de agua destilada. Calentar a ebullición hasta completa disolución. Esterilizar a 121°C durante 15 min y enfriar en baño de agua a 50°C.

Reactivos que se agregan después de esterilizar: Mezclar 0.24g de ácido nalidíxico en 5mL de agua destilada, agregar unas gotas de NaOH 0.1N hasta disolución y agregar al medio mEI y mezclar. Agregar 0.2g de cloruro de trifetil tetrazolio (TTC).

Alternativamente se pueden agregar las siguientes soluciones:

a) Ácido nalidíxico. Agregar 0.48g de ácido nalidíxico y 0.4mL de NaOH 10N a 10mL de agua destilada y mezclar. Esterilizar la solución por filtración y adicione 5.2mL por cada L de medio.

b) Cloruro de trifenetiltetrazolium (TTC): Agregar 0.1g de TTC a 10mL de agua destilada y calentar para disolver. Esterilizar la solución por filtración y adicione 2mL por cada L de medio.

c) Vaciar en cajas de 9mm x 50mm aproximadamente de 4mL a 6mL y dejar solidificar. El pH final del medio deberá estar entre 7.1 ± 0.2 . Conservar en refrigeración.

Apéndice H Normativo.**Método aprobado para la estimación de la densidad de Coliformes totales, fecales y *E. coli* por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua.**

Este método es aplicable para la estimación de la densidad de coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli* por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua.

Este método es aplicable para la detección de coliformes fecales y *E. coli*, especialmente en productos que se encuentran en bajas concentraciones de microorganismos.

H.1 INTRODUCCIÓN.

Actualmente se utilizan 3 grupos de indicadores microbianos con diferentes aplicaciones. La detección de bacterias del grupo coliforme se usan como indicador de la calidad sanitaria del agua o como indicador de las condiciones sanitarias en el procesamiento de alimentos. Los coliformes totales, fecales y *E. coli* continúan siendo el indicador de elección que manifiesta contaminación fecal reciente o condiciones higiénicas inadecuadas. El método del NMP consiste de una prueba presuntiva y confirmativa. El uso de las series de tres, cinco y diez tubos va a depender de la contaminación esperada y el grado de exactitud deseada.

El principio de la técnica se basa en la dilución de la muestra en tubos múltiples, de tal forma que todos los tubos de la menor dilución sean positivos y todos los tubos de la dilución mayor sean negativos. El resultado positivo se demuestra por la presencia de gas y crecimiento microbiano propiedad de los microorganismos coliformes para producir gas a partir de la fermentación de lactosa a $45.5^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ (para alimentos) $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ (para agua) dentro de las 48h de incubación (coliformes fecales y *E. coli*).

Para obtener el NMP en los resultados se aplica la teoría de la probabilidad, lo cual tiene como condición lo siguiente:

- Una distribución aleatoria de las bacterias que existen en la muestra.
- Las bacterias se encuentran como entidades no agrupadas.
- Los microorganismos presentes en la muestra crecerán en el medio cuando son incubados y se mantengan en las condiciones adecuadas para su desarrollo.

Alrededor del 96% de las cepas de *E. coli* incluso las cepas anaerogénicas producen la enzima beta-glucuronidasa (GUD), la cual rompe el sustrato específico 4-metilumbelliferyl-beta-D-glucurónido (MUG) en 4-metilumbelliferona (MU), que al ser expuesto a una fuente de luz UV de onda larga (365nm) produce una fluorescencia azul, fácil de observar cuando el MUG es incorporado al caldo EC o al caldo lauril.

Una excepción es la *E.coli* enterohemorrágica serotipo O157:H7, que es GUD negativa; por lo que es común que esta prueba se utilice para diferenciar este serotipo de las demás *E. coli*.

La producción de GUD por otras bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* es rara. Algunas cepas o especies de *Shigella* (44%-58%) y *Salmonella* spp (20%-29%) son GUD positivas, sin embargo no se considera una desventaja de esta prueba para su uso en salud pública.

Si se espera una cuenta microbiana alta, la muestra deberá diluirse para dar cumplimiento a las condiciones. La forma más común de realizar esta prueba es mediante diluciones decimales y usando un inóculo en series de tubos. A medida que el número de tubos inoculados para cada dilución aumenta, se reducen los límites de confianza.

H.2 EQUIPO.

H.2.1 Baño de agua con cubierta y recirculación constante que alcance una temperatura de 44.5°C , $45.5^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$;

H.2.2 Lámpara de luz UV de 365nm longitud de onda;

H.2.3 Incubadora de aire que mantenga una temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$;

H.2.4 Balanza con capacidad adecuada y sensibilidad de 0.1g;

H.2.5 Motor de licuadora u homogenizador peristáltico;

H.2.6 Potenciómetro con sensibilidad de 0.1 de unidad de pH;

H.2.7 Mecheros Bunsen, y

H.2.8 Autoclave que mantenga una temperatura interna de 121°C bajo una presión de 15 psi (1 bar), equipado con termómetro calibrado y manómetro de presión calibrado, previamente calificada.

H.3 MATERIALES.

H.3.1 Tubos de cultivo de 18mm x 150mm, 18mm x 200mm, 16mm x 150mm, 16mm x 160mm, 22 x 175mm con tapón de rosca;

H.3.2 Tubos de fermentación (campanas de Durham);

H.3.3 Gradillas de plástico y metal;

H.3.4 Asas bacteriológicas;

H.3.5 Lentes protectores;

H.3.6 Termómetro de máximas para autoclave con división mínima de 0.5°C calibrado. Se deberá registrar la inspección trimestral de la columna de mercurio del termómetro con una lupa en búsqueda de rupturas de la misma, si se observa éste deberá salir de uso;

H.3.7 Termómetro de inmersión total de 379mm de longitud de 25°C a 55°C, una escala auxiliar a 0°C con subdivisiones de 0.1°C con una precisión y exactitud de $\pm 0.1^\circ\text{C}$.

Se deberá registrar la inspección anual de la columna de mercurio del termómetro con una lupa en búsqueda de rupturas de la misma, si se observa éste deberá salir de uso;

H.3.8 Cinta testigo para procesos de esterilización por calor húmedo;

H.3.9 Vasos de licuadora estéril o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico;

H.3.10 Pipetas graduadas bacteriológicas de 0.1mL, 1mL, 2mL, 5mL y 10mL;

H.3.11 Probetas de 100mL, 500mL y 1000mL;

H.3.12 Frascos de dilución de vidrio de borosilicato con tapón esmerilado;

H.3.13 Frascos con capacidad 500mL con tapa de rosca, y

H.3.14 Espátulas, cucharas, cuchillos, pinzas.

H.4. MEDIOS DE CULTIVO.

H.4.1 Caldo A-1;

H.4.2 Caldo lauril Triptosa;

H.4.3 Caldo EC;

H.4.4 EMB-L;

H.4.5 Caldo triptona al 1%;

H.4.6 Caldo RM – VP;

H.4.7 Caldo Citrato de Koser;

H.4.8 Citrato de Simmon;

H.4.9. Caldo Lauril triptosa con MUG;

H.4.10 Caldo Verde Brillante Lactosa Bilis;

H.4.11 Agar Mc Conkey;

H.4.12 Agar Nutritivo;

H.4.13 Agar Cuenta Estándar, y

H.4.14 Caldo Lauril con MUG.

H.5. REACTIVOS.

H.5.1 Regulador de fosfatos solución concentrada;

H.5.2 Diluyente de peptona al 0.1%;

H.5.3 Reactivo de Kovac;

H.5.4 Reactivo de VP;

H.5.5 Indicador rojo de metilo, y.

H.5.6 Reactivos para la coloración de Gram.

H.6 CEPAS DE REFERENCIA

H.6.1 *E. coli* ATCC 25922, y

H.6.2 *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048.

H.7 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.**H.7.1 Procedimiento para determinar coliformes Totales, Fecales y *E. coli* en agua y hielo.**

H.7.1.1 Prueba presuntiva. Agitar vigorosamente la muestra veinticinco veces en un arco de 30° por 7s, la cantidad necesaria para el análisis deberá ser de 100mL como mínimo e inocular el caldo lauril triptosa a la concentración adecuada, como se describe en el punto H.14.1.2.

H.7.1.1.1 Agua para uso y consumo humano y envasada. Transferir 5 porciones de 20mL, 10 mL o una porción de 100mL. Consultar la tabla H.14.1.2, para seleccionar las diferentes concentraciones de caldo lauril de acuerdo a los diferentes volúmenes de muestra a inocular.

H.7.1.1.2 Agua para uso recreativo. Utilizar cinco tubos de caldo lauril por cada porción de 10mL, 1mL y 0.1mL, hacer diluciones decimales cuando se espere una densidad microbiana alta. Consultar las Tablas H.14.1.2.

H.7.1.1.3 Hielo. Fundir por completo el hielo a 45°C y realizar el análisis como agua para uso y consumo humano. Incubar los tubos de caldo lauril inoculados a 35°C ± 0.5°C por 24h a 48 h. Examinar los tubos a las 24h y observar si hay evidente formación de gas. Si no se observa la formación de gas, incubar 24h más y anotar los resultados.

H.7.1.2 Prueba confirmativa. De cada tubo que muestre formación de gas, tomar una asada y sembrar en un número igual de tubos de Caldo EC para la prueba confirmativa; inocular en tubos de EC un control positivo de *E. coli* y un control negativo de *Enterobacter aerogenes* e incubar con las muestras.

H.7.1.3 Incubar los tubos para prueba de coliformes totales a 35°C ± 0.5°C por 48h ± 2h y para la prueba de coliformes fecales a 45.5°C ± 0.2°C en baño de agua con recirculación continua durante 24h, observar si hay formación de gas, registrar la lectura, en caso de no haber formación de gas, incubar 24h más. Utilizar estos resultados para calcular el NMP de Coliformes totales y coliformes fecales respetivamente. Consultar la sección de cálculos.

Nota: Para todos los alimentos que se les determine coliformes fecales, la incubación debe ser a 45.5°C ± 0.2°C por 24h a 48h, excepto para muestras de agua que deberán incubarse a 44.5°C ± 0.2°C durante 24h a 48h.

H.7.1.4 Agua de mar para el cultivo de moluscos bivalvos. Agitar la muestra vigorosamente veinticinco veces en un arco de 30cm por 7s. Para la prueba de coliformes fecales, inocular la muestra de agua de mar directamente en cinco tubos conteniendo el Caldo A-1, por dilución en porciones de 10mL, 1mL y 0.1 mL en Medio A-1.

Incubar por 3h a 35°C ± 0.5°C para un periodo de resucitación, pasado este tiempo de incubación colocar los tubos en un baño de agua a 44.5°C ± 0.2°C por 21h ± 2h.

La producción de gas y/o efervescencia manifestada por una agitación suave de los tubos de Caldo A-1 incubados dentro de las 24h, indica una reacción positiva a coliformes de origen fecal. Para calcular el NMP/100mL consultar la Tabla correspondiente H.8.4.2 (TABLA 2).

H.7.1.5 Prueba complementaria.

H.7.1.5.1 Esta es una prueba optativa de calidad para todas las muestras de agua que tiene como objetivo confirmar el 10% de los tubos positivos de coliformes totales en caldo verde brillante. Tomar una asada de cada uno de los tubos positivos de caldo verde brillante y sembrar por estría cruzada en agar Mc Conkey. Incubar a 35°C ± 0.5°C por 24h ± 2h. Observar las colonias típicas fermentadoras de color rosa intenso que pueden estar rodeadas de un halo opaco de precipitación de las sales biliares.

H.7.1.5.2 Seleccionar 1 o más colonias aisladas con las características anteriores o lo más parecido a esta descripción e inocular igual número de tubos de fermentación con caldo lauril triptosa y a tubos con agar nutritivo inclinado. Incubar a 35°C ± 0.5°C examinar los tubos a las 24h y observar si hay formación de gas. Anotar los resultados. Si la formación de gas no se observa, incubar 24h más y anotar los resultados.

H.7.1.5.3 Realizar tinción de Gram a partir del crecimiento en el agar nutritivo para observación de la morfología microscópica de las colonias.

H.7.1.5.4 La formación de gas en los tubos de caldo lauril sulfato dentro de las 48h ± 3h y la observación de bacterias Gram negativas, en forma de bacilos no esporulados constituyen una prueba positiva a la presencia del grupo coliforme.

H.7.1.6 Prueba confirmativa para *E. coli* (por identificación bioquímica).**H.7.1.6.1 Prueba presuntiva.**

H.7.1.6.1.1 Tomar una asada de cada uno de los tubos positivos de caldo EC y/o Caldo A-1 y sembrar por estría cruzada en agar EMB-L para su aislamiento. Incubar las placas invertidas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18h - 24h. Seleccionar 2 colonias de cada placa con la morfología colonial típica: colonias con centro negro, planas con o sin brillo metálico y sembrarlas en agar cuenta estándar (placa o agar inclinado), para realizar las pruebas de morfología microscópica y pruebas bioquímicas. Incubar las placas o tubos a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18h -a 24h.

H.7.1.6.1.2 Si no hay colonias con morfología típica, probar 1 o más colonias lo más parecido a *E. coli* de cada placa. Realizar un frotis y teñirlo por Gram. Observar al microscopio la presencia de bacilos cortos Gram negativos.

H.7.1.6.1.3 Pruebas bioquímicas: Indol, Rojo de metilo, VP, citrato.

H.7.1.6.1.3.1 Producción de indol. Inocular un tubo con caldo triptona e incubarlo a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 24h $\pm$ 2h. Adicionar 0.2mL a 0.3mL de reactivo de Kovac, dejando caer las gotas del reactivo por las paredes del tubo y no agitar los tubos para observación del anillo rojo en la superficie. La presencia de una coloración roja en la superficie del tubo se considera una prueba positiva.

H.7.1.6.1.3.2 VP. Inocular un tubo con caldo MR-VP e incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 48h $\pm$ 2h. Transferir 1mL a un tubo de 13mm x 100mm. Adicionar 0.6mL de solución α -naftol y 0.2mL de KOH al 40% y agitar. Cuando se desarrolla un color de rosa a rojo en 15min a 30min, se considera una prueba positiva.

H.7.1.6.1.3.3 Rojo de metilo. A la otra parte del caldo MR-VP inocular adicionar cinco gotas de solución de rojo de metilo. Se considera una prueba positiva cuando se desarrolla un color rojo. Un color amarillo definido es una prueba negativa.

H.7.1.6.1.3.4 Citrato. Sembrar con inóculo ligero un tubo con caldo citrato de Koser, evitar turbiedad en el tubo. Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 96h. Una reacción positiva se observa mediante el desarrollo de turbiedad detectable. Se puede utilizar como alternativa citrato de Simmon el cual se debe inocular por estría. Incubar $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 48h. Una prueba positiva se observa mediante crecimiento y/o cambio a una coloración azul; la ausencia de crecimiento se considera una prueba negativa.

H.7.1.6.1.4 Interpretación de resultados de las pruebas bioquímicas.

H.7.1.6.1.4.1 Todos los cultivos que fermenten la lactosa con producción de gas dentro de las 48h a 35°C , sean bacilos o bacilos cortos Gram negativos no esporulados y se obtengan las siguientes combinaciones para el IMViC:

Pruebas	Biotipo 1*	Biotipo 2*
Indol	+	-
RM	+	+
VP	-	-
Citrato	-	-

* Son consideradas como *E. coli*.

H.7.1.6.1.4.2 Calcular el NMP de *E. coli* basada en la proporción de los tubos positivos de caldo EC confirmados. Consultar el punto H.8 Cálculos.

H.7.2 Prueba para detectar *E. coli* en alimentos refrigerados o congelados.

H.7.2.1 Prueba Presuntiva. Seguir lo indicado en el punto H.7.3. Utilizando caldo lauril con MUG en vez de caldo lauril. Inocular un tubo con una cepa de *E. coli* GUD positiva como control (ATCC 25922). Además inocular otro tubo con una cepa de *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048) como control negativo, para facilitar la diferenciación entre los tubos que presenten sólo crecimiento y crecimiento con fluorescencia. Inocular los tubos por 24h a 48h $\pm$ 2h a 35°C . Examinar cada tubo con crecimiento (turbiedad y gas), después, observar los tubos en la oscuridad con una lámpara de luz UV. Una prueba positiva para *E. coli* es la presencia de fluorescencia en el tubo. La lectura a las 24h de incubación, identifica a *E. coli* en un 83%-95%, mientras que a las 48h de incubación la identifica en un 96%-100%.

H.7.2.2 Prueba confirmativa. Confirmar todos los tubos positivos estriando en una placa de agar L-EMB, incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24h y continuar como se indica en el punto H.7.1.6.1.1.

H.7.2.2.1 Prueba confirmativa para *E. coli* (por identificación bioquímica). Calcular el NMP de *E. coli* basada en la confirmación de tubos en las tres diluciones consecutivas.

H.7.3 Procedimiento para Alimentos.

H.7.3.1 Prueba Presuntiva. Pesar 25g del alimento en 225mL de regulador de fosfatos o diluyente de peptona y moler por 2 min en vaso de licuadora u homogeneizador peristáltico, el volumen total en el vaso debe cubrir totalmente las aspás. Las muestras congeladas deben mantenerse en refrigeración (2°C-5°C) un máximo de 18h antes de su análisis, sin llegar a la descongelación. En caso de que la cantidad de muestra disponible sea menor a 25g y el análisis necesite ser efectuado (por denuncia o queja ante la autoridad), utilizar una cantidad de muestra que represente una proporción 1:10.

H.7.3.2 Preparar diluciones decimales con regulador de fosfatos. La cantidad de diluciones dependerá de la densidad de coliformes esperada. Agitar las diluciones veinticinco veces en un arco de 30cm por 7s transferir volúmenes de 1mL a tres tubos con 10mL de caldo lauril triptosa, por cada dilución por lo menos tres diluciones consecutivas (el volumen que se transfiera nunca debe ser menor del 10% de la capacidad total de la pipeta). Mantener la pipeta en ángulo de tal manera que descansa sobre el borde del tubo. El tiempo entre la homogeneización de la muestra y la inoculación de los tubos no debe exceder de 15 min a 20 min.

H.7.3.3 Utilizar como medio de enriquecimiento caldo lauril triptosa, una vez inoculados incubar a 35°C ± 0.5°C. Examinar los tubos a las 24h y observar si hay formación de gas. Anotar los resultados. Si la formación de gas no se observa, incubar 24h más y anotar los resultados.

H.7.3.4 Prueba Confirmativa. Continuar como se indica en el H.7.1.2. Prueba Confirmatoria, considerando que si la formación de gas no se observa, continuar la incubación 24h más.

H.8. CALCULOS.

H.8.1 Con frecuencia es necesario calcular el NMP con cantidades de muestra diferentes de los enlistados en las Tablas H.8.4 desde el primer número de la combinación encontrada. Si la cantidad de muestra >0.01g multiplicar el NMP enlistado en la tabla utilizada dependiendo del procedimiento realizado por 10.

H.8.2 Una determinación de cinco tubos que dé tres tubos positivos en 0.01g; dos tubos positivos en 0.001g y un tubo positivo en 0.0001g (3-2-1) el resultado obtenido al leer en la Tabla H.8.4.2 (TABLA 2), es 17, multiplicar por 10 para así obtener 170 como el NMP final por g de muestra. De igual forma si la cantidad más grande utilizada para la tabla de referencia es 1g en lugar de 0.1g, dividir el NMP derivado de la Tabla entre 10. Por ejemplo el resultado de la determinación del NMP en tres tubos para *E. coli* que dé tres tubos positivos en 1g; un tubo positivo en 0.1g y ningún positivo en 0.01g (3-1- 0) el resultado obtenido al leer en la tabla H.8.4.1 (TABLA 1) es 43 y dividir entre 10, lo que da 4.3 como el NMP presuntivo por g de muestra.

H.8.3 Un método alternativo para obtener el NMP es usando la siguiente fórmula:

$$(\text{NMP/g de la tabla} - 100) \times \text{factor de dilución del tubo de en medio} = \text{NMP/g.}$$

Para calcular el NMP/100 g multiplicar por 100.

H.8.4 Tablas.

H.8.4.1 Tabla 1. NMP para 1g de muestra cuando se usan tres tubos con porciones de 0.1; 0.01 y 0.001g.

Tubos Positivos				Tubos Positivos				Tubos Positivos				Tubos Positivos			
0,1	0,01	0,001	NMP	0,1	0,01	0,001	NMP	0,1	0,01	0,001	NMP	0,1	0,01	0,001	NMP
0	0	0	< 3	1	0	0	3,6	2	0	0	9,1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7,2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7,3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6,1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9,2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6,2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9,3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9,4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	>1100

Referencia: Official Methods of Analysis of AOAC International, 18 ed. 2005. Chapter 17.3, pag. 5

H.8.4.2 Tabla 2. NMP para 100mL de muestra cuando se usan 5 porciones en cada una de tres diluciones con series geométricas.

No. de Tubos positivos				No. de Tubos positivos				No. de Tubos positivos				No. de Tubos positivos				No. de Tubos positivos				No. de Tubos positivos			
10 mL	1 mL	0.1 mL	NMP	10 mL	1 mL	0.1 mL	NMP	10 mL	1 mL	0.1 mL	NMP	10 mL	1 mL	0.1 mL	NMP	10 mL	1 mL	0.1 mL	NMP	10 mL	1 mL	0.1 mL	NMP
0	0	0	<1.8	1	0	0	2.0	2	0	0	4.5	3	0	0	7.8	4	0	0	13	5	0	0	23
0	0	1	1.8	1	0	1	4.0	2	0	1	6.8	3	0	1	11	4	0	1	17	5	0	1	31
0	0	2	3.6	1	0	2	6.0	2	0	2	9.1	3	0	2	13	4	0	2	21	5	0	2	43
0	0	3	5.4	1	0	3	8.0	2	0	3	12	3	0	3	16	4	0	3	25	5	0	3	58
0	0	4	7.2	1	0	4	10	2	0	4	14	3	0	4	20	4	0	4	30	5	0	4	76
0	0	5	9.0	1	0	5	12	2	0	5	16	3	0	5	23	4	0	5	36	5	0	5	95
0	1	0	1.8	1	1	0	4.0	2	1	0	6.8	3	1	0	11	4	1	0	17	5	1	0	33
0	1	1	3.6	1	1	1	6.1	2	1	1	9.2	3	1	1	14	4	1	1	21	5	1	1	46
0	1	2	5.5	1	1	2	8.1	2	1	2	12	3	1	2	17	4	1	2	26	5	1	2	63
0	1	3	7.3	1	1	3	10	2	1	3	14	3	1	3	20	4	1	3	31	5	1	3	84
0	1	4	9.1	1	1	4	12	2	1	4	17	3	1	4	23	4	1	4	36	5	1	4	110
0	1	5	11	1	1	5	14	2	1	5	19	3	1	5	27	4	1	5	42	5	1	5	130
0	2	0	3.7	1	2	0	6.1	2	2	0	9.3	3	2	0	14	4	2	0	22	5	2	0	49
0	2	1	5.5	1	2	1	8.2	2	2	1	12	3	2	1	17	4	2	1	26	5	2	1	70
0	2	2	7.4	1	2	2	10	2	2	2	14	3	2	2	20	4	2	2	32	5	2	2	94
0	2	3	9.2	1	2	3	12	2	2	3	17	3	2	3	24	4	2	3	38	5	2	3	120
0	2	4	11	1	2	4	15	2	2	4	19	3	2	4	27	4	2	4	44	5	2	4	150
0	2	5	13	1	2	5	17	2	2	5	22	3	2	5	31	4	2	5	50	5	2	5	180
0	3	0	5.6	1	3	0	8.3	2	3	0	12	3	3	0	17	4	3	0	27	5	3	0	79
0	3	1	7.4	1	3	1	10	2	3	1	14	3	3	1	21	4	3	1	33	5	3	1	110
0	3	2	9.3	1	3	2	13	2	3	2	17	3	3	2	24	4	3	2	39	5	3	2	140
0	3	3	11	1	3	3	15	2	3	3	20	3	3	3	28	4	3	3	45	5	3	3	180
0	3	4	13	1	3	4	17	2	3	4	22	3	3	4	31	4	3	4	52	5	3	4	210
0	3	5	15	1	3	5	19	2	3	5	25	3	3	5	35	4	3	5	59	5	3	5	250
0	4	0	7.5	1	4	0	11	2	4	0	15	3	4	0	21	4	4	0	34	5	4	0	130
0	4	1	9.4	1	4	1	13	2	4	1	17	3	4	1	24	4	4	1	40	5	4	1	170
0	4	2	11	1	4	2	15	2	4	2	20	3	4	2	28	4	4	2	47	5	4	2	220
0	4	3	13	1	4	3	17	2	4	3	23	3	4	3	32	4	4	3	54	5	4	3	280
0	4	4	15	1	4	4	19	2	4	4	25	3	4	4	36	4	4	4	62	5	4	4	350
0	4	5	17	1	4	5	22	2	4	5	28	3	4	5	40	4	4	5	69	5	4	5	430
0	5	0	9.4	1	5	0	13	2	5	0	17	3	5	0	25	4	5	0	41	5	5	0	240
0	5	1	11	1	5	1	15	2	5	1	20	3	5	1	29	4	5	1	48	5	5	1	350
0	5	2	13	1	5	2	17	2	5	2	23	3	5	2	32	4	5	2	56	5	5	2	540
0	5	3	15	1	5	3	19	2	5	3	26	3	5	3	37	4	5	3	64	5	5	3	920
0	5	4	17	1	5	4	22	2	5	4	29	3	5	4	41	4	5	4	72	5	5	4	1600
0	5	5	19	1	5	5	24	2	5	5	32	3	5	5	45	4	5	5	81	5	5	5	>1600

Referencia: Official Methods of Analysis of AOAC International, 18 ed. 2005. Chapter 17.3.

H.8.4.3 Tabla 3. NMP 100mL de muestra de agua o hielo e intervalos de confianza del 95% utilizando cinco tubos con 20 mL de muestra.

Tubos positivo	NMP/100mL	95% de Limite de confianza (aproximado)	
		Inferior	Superior
0	<1.1	0	3.0
1	1.1	0.05	6.3
2	2.6	0.3	9.6
3	4.6	0.8	14.7
4	8.0	1.7	26.4
5	>8.0	4.0	-

Referencia: American Public Health Association. Standard Methods for the examination of Water and Wastewater. 20th edition 1998. Washington DC.

H.8.4.4 Tabla 4. NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando diez tubos con 10mL de muestra.

Tubos positivos	NMP/100mL	Límite de confianza	
		Interior	Superior
0	<1.1	-	3.3
1	1.1	0.05	5.9
2	2.2	0.37	8.1
3	3.6	0.91	9.7
4	5.1	1.6	13
5	9	2.5	15
6	9.2	3.3	19
7	12	4.8	24
8	16	5.9	33
9	23	8.1	53
10	>23	12	-

Referencia: Americana Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th edition 1998. Washington DC.

H.8.4.5 Tabla 5. NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando tres tubos con 0.1g, 0.01g y 0.001g de muestra.

NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando tres tubos con 0.1g, 0.01g y 0.001g de muestra.											
Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza	
0.10	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.10	0.01	0.001		Inferior	Superior
0	0	0	<3.0	-	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	-

Referencia: Bacteriological Analytical Manual. FDA, 8th Edición, Revisión A, 1998 Actualización Diciembre 2003.

H.8.4.6 Tabla 6. NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando cinco tubos con 0.1g, 0.01g y 0.001 g de muestra.

NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando cinco tubos con 0.1g, 0.01g y 0.001 g de muestra.											
Tubos positivos			NMP/ g	Límites de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Límites de confianza	
0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior
0	0	0	<.90	—	3.1	8	2	0	17	7.7	34
0	0	1	0.9	0.04	3.1	8	2	1	19	9	34
0	0	2	1.8	0.33	5.1	8	2	2	21	10	39
0	1	0	0.9	0.04	3.6	8	2	3	23	11	44
0	1	1	1.8	0.33	5.1	8	3	0	19	9	34
0	2	0	1.8	0.33	5.1	8	3	1	21	10	39
0	2	1	2.7	0.8	7.2	8	3	2	24	11	44
0	3	0	2.7	0.8	7.2	8	3	3	26	12	50
1	0	0	0.94	0.05	5.1	8	4	0	22	10	39
1	0	1	1.9	0.33	5.1	8	4	1	24	11	44
1	0	2	2.8	0.8	7.2	8	4	2	26	12	50
1	1	0	1.9	0.33	5.7	8	4	3	29	14	58
1	1	1	2.9	0.8	7.2	8	5	0	24	11	44
1	1	2	3.8	1.4	9	8	5	1	27	12	50
1	2	0	2.9	0.8	7.2	8	5	2	29	14	58
1	2	1	3.8	1.4	9	8	5	3	32	15	62
1	3	0	3.8	1.4	9	8	6	0	27	12	50
1	3	1	4.8	2.1	11	8	6	1	30	14	58
1	4	0	4.8	2.1	11	8	6	2	33	15	62
2	0	0	2	0.37	7.2	8	7	0	30	14	58
2	0	1	3	0.81	7.3	8	7	1	33	17	73
2	0	2	4	1.4	9	8	7	2	36	17	74
2	1	0	3	0.82	7.8	8	8	0	34	17	73
2	1	1	4	1.4	9	8	8	1	37	17	74
2	1	2	5	2.1	11	9	0	0	17	7.5	31
2	2	0	4	1.4	9.1	9	0	1	19	9	34
2	2	1	5	2.1	11	9	0	2	22	10	39
2	2	2	6.1	3	14	9	0	3	24	11	44
2	3	0	5.1	2.1	11	9	1	0	19	9	39
2	3	1	6.1	3	14	9	1	1	22	10	40
2	4	0	6.1	3	14	9	1	2	25	11	44
2	4	1	7.2	3.1	15	9	1	3	28	14	58
2	5	0	7.2	3.1	15	9	1	4	31	14	58
3	0	0	3.2	0.9	9	9	2	0	22	10	44
3	0	1	4.2	1.4	9.1	9	2	1	25	11	46
3	0	2	5.3	2.1	11	9	2	2	28	14	58
3	1	0	4.2	1.4	10	9	2	3	32	14	58
3	1	1	5.3	2.1	11	9	2	4	35	17	73
3	1	2	6.4	3	14	9	3	0	25	12	50
3	2	0	5.3	2.1	12	9	3	1	29	14	58
3	2	1	6.4	3	14	9	3	2	32	15	62
3	2	2	7.5	3.1	15	9	3	3	36	17	74
3	3	0	6.5	3	14	9	3	4	40	20	91
3	3	1	7.6	3.1	15	9	4	0	29	14	58
3	3	2	8.7	3.6	17	9	4	1	33	15	62
3	4	0	7.6	3.1	15	9	4	2	37	17	74
3	4	1	8.7	3.6	17	9	4	3	41	20	91
3	5	0	8.8	3.6	17	9	4	4	45	20	91
4	0	0	4.5	1.6	11	9	5	0	33	17	73

NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando cinco tubos con 0.1g, 0.01g y 0.001 g de muestra.

Tubos positivos			NMP/ g	Límites de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Límites de confianza	
0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior
4	0	1	5.6	2.2	12	9	5	1	37	17	74
4	0	2	6.8	3	14	9	5	2	42	20	91
4	1	0	5.6	2.2	12	9	5	3	46	20	91
4	1	1	6.8	3	14	9	5	4	51	25	120
4	1	2	8	3.6	17	9	6	0	38	17	74
4	2	0	6.8	3	15	9	6	1	43	20	91
4	2	1	8	3.6	17	9	6	2	47	21	100
4	2	2	9.2	3.7	17	9	6	3	53	25	120
4	3	0	8.1	3.6	17	9	7	0	44	20	91
4	3	1	9.3	4.5	18	9	7	1	49	21	100
4	3	2	10	5	20	9	7	2	54	25	120
4	4	0	9.3	4.5	18	9	7	3	60	26	120
4	4	1	11	5	20	9	8	0	50	25	120
4	5	0	11	5	20	9	8	1	55	25	120
4	5	1	12	5.6	22	9	8	2	61	26	120
4	6	0	12	5.6	22	9	8	3	68	30	140
5	0	0	6	2.5	14	9	9	0	57	25	120
5	0	1	7.2	3.1	15	9	9	1	63	30	140
5	0	2	8.5	3.6	17	9	9	2	70	30	140
5	0	3	9.8	4.5	18	10	0	0	23	11	44
5	1	0	7.3	3.1	15	10	0	1	27	12	50
5	1	1	8.5	3.6	17	10	0	2	31	14	58
5	1	2	9.8	4.5	18	10	0	3	37	17	73
5	1	3	11	5	21	10	1	0	27	12	57
5	2	0	8.6	3.6	17	10	1	1	32	14	61
5	2	1	9.9	4.5	18	10	1	2	38	17	74
5	2	2	11	5	21	10	1	3	44	20	91
5	3	0	10	4.5	18	10	1	4	52	25	120
5	3	1	11	5	21	10	2	0	33	15	73
5	3	2	13	5.6	23	10	2	1	39	17	79
5	4	0	11	5	21	10	2	2	46	20	91
5	4	1	13	5.6	23	10	2	3	54	25	120
5	4	2	14	7	26	10	2	4	63	30	140
5	5	0	13	6.3	25	10	3	0	40	17	91
5	5	1	14	7	26	10	3	1	47	20	100
5	6	0	14	7	26	10	3	2	56	25	120
6	0	0	7.8	3.1	17	10	3	3	66	30	140
6	0	1	9.2	3.6	17	10	3	4	77	34	150
6	0	2	11	5	20	10	3	5	89	39	180
6	0	3	12	5.6	22	10	4	0	49	21	120
6	1	0	9.2	3.7	18	10	4	1	59	25	120
6	1	1	11	5	21	10	4	2	70	30	150
6	1	2	12	5.6	22	10	4	3	82	38	180
6	1	3	14	7	26	10	4	4	94	44	180
6	2	0	11	5	21	10	4	5	110	50	210
6	2	1	12	5.6	22	10	5	0	62	26	140
6	2	2	14	7	26	10	5	1	74	30	150
6	2	3	15	7.4	30	10	5	2	87	38	180
6	3	0	12	5.6	23	10	5	3	100	44	180

NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando cinco tubos con 0.1g, 0.01g y 0.001 g de muestra.

Tubos positivos			NMP/ g	Límites de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Límites de confianza	
0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior
6	3	1	14	7	26	10	5	4	110	50	210
6	3	2	15	7.4	30	10	5	5	130	57	220
6	4	0	14	7	26	10	5	6	140	70	280
6	4	1	15	7.4	30	10	6	0	79	34	180
6	4	2	17	9	34	10	6	1	94	39	180
6	5	0	16	7.4	30	10	6	2	110	50	210
6	5	1	17	9	34	10	6	3	120	57	220
6	5	2	19	9	34	10	6	4	140	70	280
6	6	0	17	9	34	10	6	5	160	74	280
6	6	1	19	9	34	10	6	6	180	91	350
6	7	0	19	9	34	10	7	0	100	44	210
7	0	0	10	4.5	20	10	7	1	120	50	220
7	0	1	12	5	21	10	7	2	140	61	280
7	0	2	13	6.3	25	10	7	3	150	73	280
7	0	3	15	7.2	28	10	7	4	170	91	350
7	1	0	12	5	22	10	7	5	190	91	350
7	1	1	13	6.3	25	10	7	6	220	100	380
7	1	2	15	7.2	28	10	7	7	240	110	480
7	1	3	17	7.7	31	10	8	0	130	60	250
7	2	0	13	6.4	26	10	8	1	150	70	280
7	2	1	15	7.2	28	10	8	2	170	80	350
7	2	2	17	7.7	31	10	8	3	200	90	350
7	2	3	19	9	34	10	8	4	220	100	380
7	3	0	15	7.2	30	10	8	5	250	120	480
7	3	1	17	9	34	10	8	6	280	120	480
7	3	2	19	9	34	10	8	7	310	150	620
7	3	3	21	10	39	10	8	8	350	150	620
7	4	0	17	9	34	10	9	0	170	74	310
7	4	1	19	9	34	10	9	1	200	91	380
7	4	2	21	10	39	10	9	2	230	100	480
7	4	3	23	11	44	10	9	3	260	120	480
7	5	0	19	9	34	10	9	4	300	140	620
7	5	1	21	10	39	10	9	5	350	150	630
7	5	2	23	11	44	10	9	6	400	180	820
7	6	0	21	10	39	10	9	7	460	210	970
7	6	1	23	11	44	10	9	8	530	210	970
7	6	2	25	12	46	10	9	9	610	280	1300
7	7	0	23	11	44	10	10	0	240	110	480
7	7	1	26	12	50	10	10	1	290	120	620
8	0	0	13	5.6	25	10	10	2	350	150	820
8	0	1	15	7	26	10	10	3	430	180	970
8	0	2	17	7.5	30	10	10	4	540	210	1300
8	0	3	19	9	34	10	10	5	700	280	1500
8	1	0	15	7.1	28	10	10	6	920	350	1900
8	1	1	17	7.7	31	10	10	7	1200	480	2400
8	1	2	19	9	34	10	10	8	1600	620	3400
8	1	3	21	10	39	10	10	9	2300	810	5300
						10	10	10	>2300	1300	—

H.8.4.7 Tabla 7. NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando diez tubos con 0.1g, 0.01g y 0.001g de muestra.

NMP por gramo de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando 10 tubos con 0.1; 0.01 y 0.001 g de muestra											
Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza	
0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior
3	4	0	7.6	3.1	15	9	4	2	37	17	74
3	4	1	8.7	3.6	17	9	4	3	41	20	91
3	5	0	8.8	3.6	17	9	4	4	45	20	91
4	0	0	4.5	1.6	11	9	5	0	33	17	73
4	0	1	5.6	2.2	12	9	5	1	37	17	74
4	0	2	6.8	3	14	9	5	2	42	20	91
4	1	0	5.6	2.2	12	9	5	3	46	20	91
4	1	1	6.8	3	14	9	5	4	51	25	120
4	1	2	8	3.6	17	9	6	0	38	17	74
4	2	0	6.8	3	15	9	6	1	43	20	91
4	2	1	8	3.6	17	9	6	2	47	21	100
4	2	2	9.2	3.7	17	9	6	3	53	25	120
4	3	0	8.1	3.6	17	9	7	0	44	20	91
4	3	1	9.3	4.5	18	9	7	1	49	21	100
4	3	2	10	5	20	9	7	2	54	25	120
4	4	0	9.3	4.5	18	9	7	3	60	26	120
4	4	1	11	5	20	9	8	0	50	25	120
4	5	0	11	5	20	9	8	1	55	25	120
4	5	1	12	5.6	22	9	8	2	61	26	120
4	6	0	12	5.6	22	9	8	3	68	30	140
5	0	0	6	2.5	14	9	9	0	57	25	120
5	0	1	7.2	3.1	15	9	9	1	63	30	140
5	0	2	8.5	3.6	17	9	9	2	70	30	140
5	0	3	9.8	4.5	18	10	0	0	23	11	44
5	1	0	7.3	3.1	15	10	0	1	27	12	50
5	1	1	8.5	3.6	17	10	0	2	31	14	58
5	1	2	9.8	4.5	18	10	0	3	37	17	73
5	1	3	11	5	21	10	1	0	27	12	57
5	2	0	8.6	3.6	17	10	1	1	32	14	61
5	2	1	9.9	4.5	18	10	1	2	38	17	74
5	5	5	11	5	21	10	1	3	44	20	91
5	3	0	10	4.5	18	10	1	4	52	25	120
5	3	1	11	5	21	10	2	0	33	15	73
5	3	2	13	5.6	23	10	2	1	39	17	79
5	4	0	11	5	21	10	2	2	46	20	91
5	4	1	13	5.6	23	10	2	3	54	25	120
5	4	2	14	7	26	10	2	4	63	30	140
5	5	0	13	6.3	25	10	3	0	40	17	91
5	5	1	14	7	26	10	3	1	47	20	100
5	6	0	14	7	26	10	3	2	56	25	120
6	0	0	7.8	3.1	17	10	3	3	66	30	140
6	0	1	9.2	3.6	17	10	3	4	77	34	150
6	0	2	11	5	20	10	3	5	89	39	180
6	0	3	12	5.6	22	10	4	0	49	21	120
6	1	0	9.2	3.7	18	10	4	1	59	25	120
6	1	1	11	5	21	10	4	2	70	30	150
6	1	2	12	5.6	22	10	4	3	82	38	180
6	1	3	14	7	26	10	4	4	94	44	180
6	2	0	11	5	21	10	4	5	110	50	210
6	2	1	12	5.6	22	10	5	0	62	26	140

NMP por gramo de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando 10 tubos con 0.1; 0.01 y 0.001 g de muestra											
Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza	
0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior
6	2	2	14	7	26	10	5	1	74	30	150
6	2	3	15	7.4	30	10	5	2	87	38	180
6	3	0	12	5.6	23	10	5	3	100	44	180
6	3	1	14	7	26	10	5	4	110	50	210
6	3	2	15	7.4	30	10	5	5	130	57	220
6	4	0	14	7	26	10	5	6	140	70	280
6	4	1	15	7.4	30	10	6	0	79	34	180
6	4	2	17	9	34	10	6	1	94	39	180
6	5	0	16	7.4	30	10	6	2	110	50	210
6	5	1	17	9	34	10	6	3	120	57	220
6	5	2	19	9	34	10	6	4	140	70	280
6	6	0	17	9	34	10	6	5	160	74	280
6	6	1	19	9	34	10	6	6	180	91	350
6	7	0	19	9	34	10	7	0	100	44	210
7	0	0	10	4.5	20	10	7	1	120	50	220
7	0	1	12	5	21	10	7	2	140	61	280
7	0	2	13	6.3	25	10	7	3	150	73	280
7	0	3	15	7.2	28	10	7	4	170	91	350
7	1	0	12	5	22	10	7	5	190	91	350
7	1	1	13	6.3	25	10	7	6	220	100	380
7	1	2	15	7.2	28	10	7	7	240	110	480
7	1	3	17	7.7	31	10	8	0	130	60	250
7	2	0	13	6.4	26	10	8	1	150	70	280
7	2	1	15	7.2	28	10	8	2	170	80	350
7	2	1	17	7.7	31	10	8	3	200	90	350
7	2	3	19	9	34	10	8	4	220	100	380
7	3	0	15	7.2	30	10	8	5	250	120	480
7	3	1	17	9	34	10	8	6	280	120	480
7	3	2	19	9	34	10	8	7	310	150	620
7	3	3	21	10	39	10	8	8	350	150	620
7	4	0	17	9	34	10	9	0	170	74	310
7	4	1	19	9	34	10	9	1	200	91	380
7	4	2	21	10	39	10	9	2	230	100	480
7	4	3	23	11	44	10	9	3	260	120	480
7	5	0	19	9	34	10	9	4	300	140	620
7	5	1	21	10	39	10	9	5	350	150	630
7	5	2	23	11	44	10	9	6	400	180	820
7	6	0	21	10	39	10	9	7	460	210	970
7	6	1	23	11	44	10	9	8	530	210	970
7	6	2	25	12	46	10	9	9	610	280	1300
7	7	0	23	11	44	10	10	0	240	110	480
7	7	1	26	12	50	10	10	1	290	120	620
8	0	0	13	5.6	25	10	10	2	350	150	820
8	0	1	15	7	26	10	10	3	430	180	970
8	0	2	17	7.5	30	10	10	4	540	210	1300
8	0	3	19	9	34	10	10	5	700	280	1500
8	1	0	15	7.1	28	10	10	6	920	350	1900
8	1	1	17	7.1	31	10	10	7	1200	480	2400
8	1	2	19	9	34	10	10	8	1600	620	3400
8	1	3	21	10	39	10	10	9	2300	810	5300
						10	10	10	>2300	1300	--

H.8.4.8 Tabla 8. NMP por 100mL de muestra inoculando tubos de cada una de tres diluciones geométricas.

Tubos positivos mL			NMP	Tubos positivos mL			NMP	Tubos positivos mL			NMP	Tubos positivos mL			NMP
10	1	0.1		10	1	0.1		10	1	0.1		10	1	0.1	
0	0	0	<3	1	0	0	3.6	2	0	0	9.1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7.2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7.3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6.1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9.2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6.2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9.3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9.4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	>1100

Referencia: Recommended Procedures for the Examination of Sea Water and Shellfish. Fourth Edition 1970. APHA. New York

H.8.5 ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD MICROBIANA POR LA TÉCNICA DE NMP. Uso de Tablas de NMP con 95% de límite de confianza.

H.8.5.1 Las Tablas H.8.4.5 (Tabla 5), H.8.4.6 (Tabla 6), H.8.4.7 (Tabla 7) presentan la estimación estadística de los valores del NMP que corresponden al 95% de límite de confianza cuando se utilizan tres, cinco y diez tubos. Otras combinaciones de resultados positivos y negativos no encontrados en estas Tablas, tienen muy baja probabilidad de que se presenten. Si los resultados no están incluidos en las Tablas, se deberá repetir la prueba a partir de la muestra original. Si no es posible, el NMP se puede obtener aplicando una ecuación (véase H.9 y el 95% de Límite de Confianza) para tener el NMP aproximado (para las combinaciones de tres y cinco tubos).

H.8.5.2 El intervalo del 95% de confianza se interpreta como sigue: si el analista supone que el número real de microorganismos cae dentro de los límites, entonces se asume que será correcto el 95% de las veces. El valor del NMP tabulado representa un intervalo y no un valor absoluto.

H.8.5.3 Cuando se preparan más de tres diluciones de una muestra, el NMP deberá determinarse a partir de los resultados de tres diluciones consecutivas. Primero, para todas las diluciones que tengan todos los tubos positivos, seleccionar la dilución mayor. Después usar las dos siguientes diluciones mayores. Cuando en ninguna de las diluciones probadas hubiera crecimiento en todos los tubos, seleccionar (si es posible) las primeras tres diluciones consecutivas para que la dilución media contenga resultados positivos. Cuando se presenta un resultado positivo en la dilución más alta no seleccionada (menor cantidad de muestra), sumar el número de tubos positivos a la dilución más alta seleccionada. Cuando todos los tubos de todas las diluciones son positivos seleccionar las tres diluciones más altas.

H.8.5.3.1 Ejemplo para determinar el NMP estimado en series de 3 tubos con 1g (mL) de muestra por tubo.

Ejemplo	Cantidad de muestra (g o mL) ^a					Valores positivos reportados	NMP estimado/g o mL ^b
	0.1	0.01	0.001	0.0001	0.00001		
A	3/3	3/3	2/3	0/3	0/3	3-2-0	930
B	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3	3-2-0	9300
C	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0-1-0	30
D	3/3	3/3	2/3	1/3	1/3	3-2-2	2100
E	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3-3-3	>110000

^a Numerador/denominador = número de tubos positivos/número de tubos inoculados

^b Multiplicar todos los valores de NMP/g (mL) por 100 para expresarlos como NMP/100g (mL)

H.8.5.3.2 Ejemplo para determinar el NMP estimado en series de cinco tubos con 1g (mL) de muestra por tubo.

Ejemplo	Cantidad de muestra (g o mL) ^a					Valores positivos reportados	NMP estimado/g o mL ^b
	0.1	0.01	0.001	0.0001	0.00001		
A	5/5	5/5	2/5	0/5	0/5	5-2-0	490
B	5/5	5/5	5/5	2/5	0/5	5-2-0	4900
C	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0-1-0	18
D	5/5	5/5	3/5	1/5	1/5	5-3-2	1400
E	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5-5-5	>160000

^a Numerador/denominador = número de tubos positivos/número de tubos inoculados.

^b Multiplicar todos los valores de NMP/g (mL) por 100 para expresarlos como NMP/100 g (mL).

H.9 CÁLCULO APROXIMADO DEL NMP Y EL 95% DE LÍMITE DE CONFIANZA.

H.9.1 Debido a la inherente complejidad para calcular los límites de confianza del NMP lo más común es el uso de Tablas. Generalmente estas Tablas están limitadas al uso de tres, cinco y diez tubos por dilución, incluso usando un método aceptado, pueden presentarse datos irregulares o accidentes de laboratorio que causan pérdida de uno o más tubos de dilución. En este caso una serie de diluciones de por ejemplo: 5, 4, 4 puede dar una lectura de 5-2-0. Para estos casos se puede aplicar una fórmula sencilla, la cual no corresponde exactamente con los resultados obtenidos teóricamente; sin embargo, las desviaciones generalmente son pequeñas, esta fórmula no debe ser aplicada para fines de regulación. La fórmula no restringe el número de tubos o las diluciones y puede aplicarse para todo tipo de pruebas. El cálculo aproximado de Thomas está dado por la siguiente ecuación:

$$\text{NMP/g} = P/(N T)^{1/2}$$

Donde: P es el número de tubos positivos, N es la cantidad total de muestra (g) en todos los tubos negativos y T es la cantidad total de muestra (g) en todos los tubos.

Por ejemplo, considerando que se tuvieran serie de diluciones al doble:

MUESTRA (g)	No. DE TUBOS	No. DE TUBOS POSITIVOS
8	5	5
4	5	4
2	5	2
1	5	0
0.5	5	1
0.25	5	0

El número de tubos positivos es:

$$P = (5 + 4 + 2 + 1) = 12;$$

$$N = (8 \times 0) + (4 \times 1) + (2 \times 3) + (1 \times 5) + (0.5 \times 4) + (0.25 \times 5) = 18, 25; \text{ y}$$

$$I = 5 (8 + 4 + 2 + 1 + 0.5 + 0.25) = 78,75$$

$$NPM/g = 12 / (18,25 \times 78,75)^{1/2} = 0,32/g \text{ o } 32/100 \text{ g.}$$

Los límites de confianza del 95% estimados, pueden obtenerse del antilogaritmo de base 10 con la siguiente ecuación:

$$\log (NMP/g) \pm 1,078 [(\log a)/n]^{1/2}$$

$$\log (NMP/g) \pm (1,96) (0,55)$$

Donde: a es el radio de dilución 2 y

n es el número de tubos por dilución.

Para el ejemplo anterior el NMP con n = 5 y un límite de confianza aproximado de 95% será el siguiente:

$$\log 0,32 \pm (1,078)[(\log a)/n]^{1/2}$$

$$= -0,495 \pm 0,265$$

Entonces el límite inferior es el antilogaritmo $(-0,76) = 0,17/g$ o 17/100 g y el límite superior es el antilogaritmo $(-0,23) = 0,59/g$ o 59/100 g. Cuando se compara con las Tablas el NMP podría ser 0,31/g con límites de confianza de 0,16/g y 0,57/g.

H.10 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

H.10.1 Expresar en NMP/g o mL para alimentos y NMP/100mL para agua.

H.10.2 Cuando se obtienen resultados negativos (ausencia de gas en los tubos), informar el límite de detección que corresponde a menos del valor más bajo del NMP de la Tabla utilizada. Excepto en los casos de agua para uso y consumo humano que como lo indica la Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización, debe expresarse como "No detectable" o "ND".

H.11 MEDIDAS DE CONTROL DE CALIDAD.

H.11.1 Verificar la funcionalidad del procedimiento analítico mediante cultivos control con cepas de *E. coli* y *E. aerogenes* para coliformes fecales y *E. coli* y *K. pneumoniae* para la determinación de *E. coli* con caldo EC-MUG.

H.11.2 Registrar las temperaturas de incubación con termómetros verificados.

H.11.3 Pesar la muestra en balanza calibrada y verificada.

H.11.4 Verificar el ciclo de esterilización de autoclaves con indicador biológico y termómetro de máximas calibrado o verificado.

H.11.5 Verificar el ciclo de esterilización de hornos con indicador biológico.

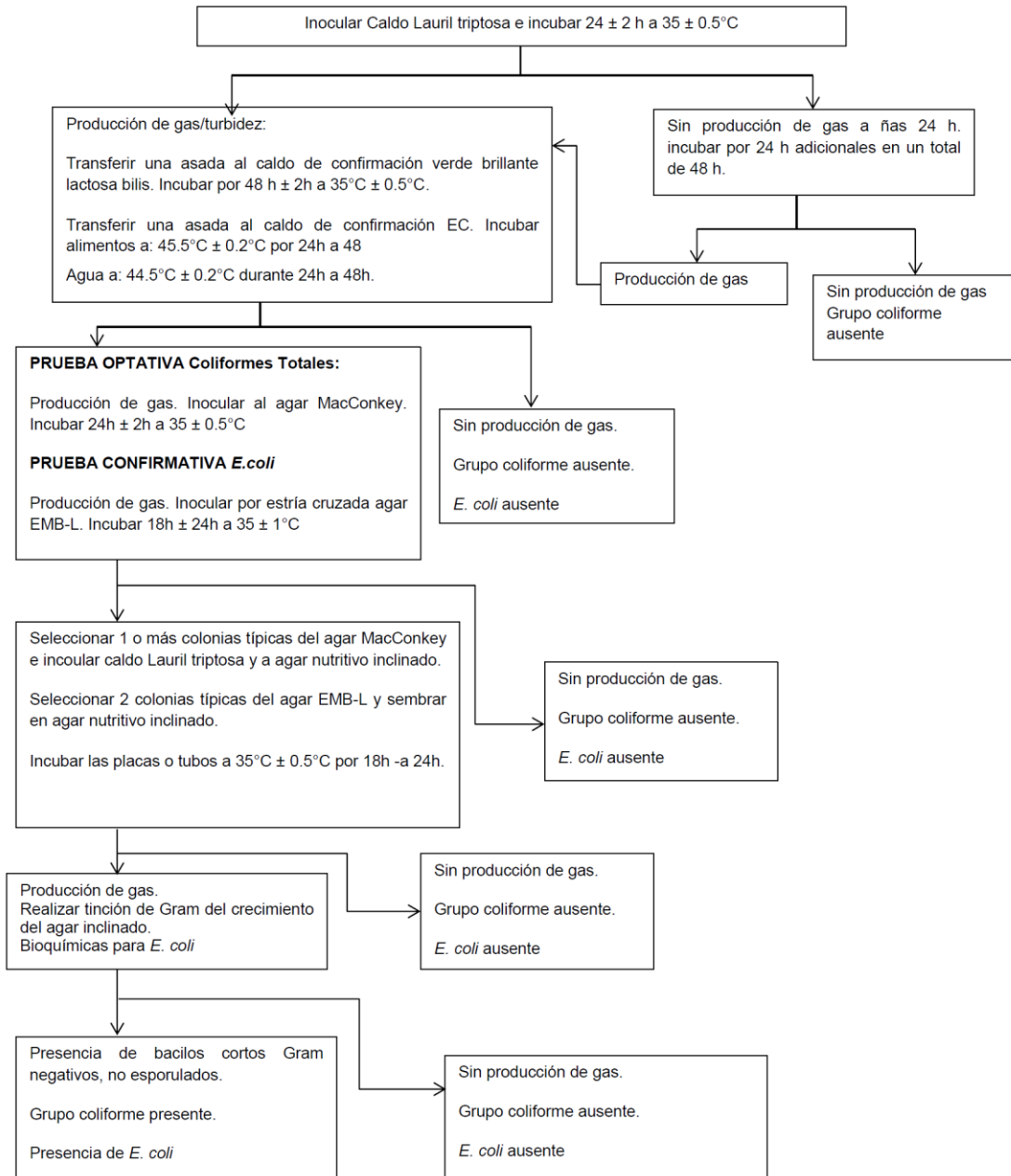
H.11.6 Realizar control de medios de cultivo con cepas tipo (evaluación biológica) y evaluación física.

H.11.7 Realizar control ambiental por el método de sedimentación.

H.12 VALIDEZ DE LA PRUEBA.

H.12.1 Cuando todos los tubos de la menor dilución sean positivos y todos los tubos de la dilución mayor sean negativos o la combinación de ambos.

H.12.2 Si el crecimiento de los controles no es característico, la prueba se invalida.

H.13 Diagrama de Flujo.**H.14 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.**

H.14.1 Caldo A-1. El caldo A-1 debe prepararse a partir de sus ingredientes individuales. Las fórmulas comerciales no son aceptables.

H.14.1.1 Fórmula.

Este medio se debe preparar a partir de los siguientes ingredientes:

Lactosa	5.0g
Triptona	20.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Salicina	0.5g
Eter p-isooctilfenil polietilen glicol (Tritón X-100)	1.0mL
Agua destilada	1000mL

H.14.1.2 Preparación: Disolver los ingredientes en 1L de agua destilada hasta su disolución, calentar suavemente sólo si es necesario, agregar 1mL del Tritón X-100 y ajustar el pH a 6.9 ± 0.1 . Para alícuotas de 10mL de muestra preparar y utilizar el medio a doble concentración (2X). Para lograr aproximadamente el mismo nivel del medio e inocular en todos los tubos, distribuir porciones de 10mL del caldo en tubos de 18mm x 150mm. Los tubos deben contener campanas de Durham; usar tubos de 22mm x 175mm para el caldo a doble concentración (2X). Esterilizar en autoclave a 121°C por 10min y guardar el medio a temperatura ambiente en un lugar oscuro por no más de 7 días, para evitar la formación de precipitado o floculo.

H.14.2 Caldo lauril Triptosa.

H.14.2.1 Fórmula.

Bacto triptosa	20.0g
Bacto lactosa	5.0g
Fosfato potásico dibásico	2.75g
Fosfato potásico monobásico	2.75g
Cloruro de sodio	5.0g
Lauril sulfato de sodio	0.1g
Agua destilada	1000mL
pH final: 6.8 ± 0.2 a 25°C.	

H.14.2.2 Preparación: Disolver los ingredientes en 1L de agua destilada, ajustar el pH si es necesario y distribuir en tubos de ensaye 16mm x 150mm con campanas de Durham. Adicionar el volumen de medio de acuerdo con la siguiente tabla cuando se prepare a partir de medio completo deshidratado. Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121°C.

Preparación de caldo lauril triptosa.

Cantidad de muestra inoculada (mL)	Cantidad de medio por tubo (mL)	Volumen de medio más inóculo (mL)	Caldo lauril Triptosa requerido g/l
1	10 o más	11 o más	35.6
10	10	20	71.2
10	20	30	53.4
20	10	30	106.8
100	50	150	106.8
100	35	135	137.1
100	20	120	213.6

H.14.3 Caldo EC.

H.14.3.1 Fórmula.

Bacto triptosa o tripticasa	20.0g
Bacto lactosa	5.0g
Bacto sales biliares No. 3	1.5g
Fosfato dipotásico	4.0g
Fosfato monopotásico	1.5g
Cloruro de sodio	5.0g
Agua destilada	1000mL
pH final: 6.9 ± 0.2 a 25°C.	

H.14.3.2 Preparación: Disolver los ingredientes en 1L de agua destilada, dejar en reposo durante 5 min a 10 min, mezclar bien hasta que se disuelva por completo. Ajustar el pH si es necesario. Distribuir en porciones de 10mL en tubos de ensaye de 16mm x 150mm con campanas de Durham y esterilizar en autoclave durante 15 min a 121°C.

H.14.4 EMB-L.

H.14.4.1 Fórmula.

Peptona	10.0g
Lactosa	10.0g
K ₂ HPO ₄	2.0g
Eosina Y	0.4g
Azul de metileno	0.065g
Agar	15.0g
Agua destilada	1000mL
pH final: 7,1 ± 0,2	

H.14.4.2 Preparación: Disolver la peptona, el fosfato y el agar en 1L de agua, calentar hasta ebullición para la disolución completa, distribuir en porciones de 100mL o 200mL y esterilizar a no más de 121°C por 15 min.

Fundir antes de su uso y adicionar a cada porción de 100mL lo siguiente:

- 5mL de solución de lactosa al 20% estéril.
- 2mL de solución acuosa de eosina y al 2%.
- 4.3mL de solución acuosa de azul de metileno al 0.15%.

Cuando se use el producto deshidratado disolver todos los ingredientes de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

H.14.5 Caldo triptona al 1%.

H.14.5.1 Fórmula.

Triptona o tripticasa	10g
Agua destilada	1000mL
pH final: 6.9 ± 0.2	

H.14.5.2 Preparación: Disolver los ingredientes, distribuir en porciones de 5mL en tubos de ensaye de 16mm x 125mm o 16mm x 150mm y esterilizar a 121°C por 15 min.

H.14.6 Caldo MR – VP.

H.14.6.1 Fórmula.

Peptona tamponada	7g
Glucosa	5g
K ₂ HPO ₄	5g
Agua destilada	1000mL
pH final: 6.9 ± 0.2	

o

Digerido Pancreático de caseína	3.5g
Digerido péptico de tejido animal	3.5g
Dextrosa	5g
Fosfato de potasio	5g
Agua destilada	1000mL
pH 6.9 ± 0.2	

0

Peptona	5g
Glucosa	5g
Regulador de Fosfatos	5g
Agua destilada	1000mL
pH 7.5 ± 0.2	

H.14.6.2 Preparación: Disolver los ingredientes con calentamiento suave si es necesario, distribuir en volúmenes de 10mL en tubos de ensaye de 16mm x 150mm y esterilizar a 121°C por 15min.

H.14.7 Caldo Citrato de Koser.

H.14.7.1 Fórmula.

NaNH ₄ HPO ₄ 4H ₂ O	1.5g
KH ₂ PO ₄ (monobásico)	1.0g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2g
Citrato de sodio 2H ₂ O	3.0g
Agua destilada	1000mL

H.14.7.2 Preparación: Distribuir 5mL del caldo preferentemente en tubos de ensaye con tapa de rosca y esterilizar a 121°C por 15 min.

Esta formulación se recomienda en los métodos de análisis oficial de AOAC y en los Métodos Estándares para el Análisis de Agua y Aguas de Desecho (APHA). Éste difiere de la composición del medio deshidratado disponible comercialmente y es recomendable su uso.

H.14.8 Citrato de Simmon.

H.14.8.1 Fórmula.

NaNH ₄ HPO ₄ •4H ₂ O	1.0g a 1.5g
KH ₂ PO ₄ (monobásico)	1.0g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.2g
Citrato de sodio 2H ₂ O	2.0g a 3.0g
NaCl	5.0g
Agar	13g-15g
Azul de bromotimol	0.08g
Agua destilada	1000 mL

H.14.8.2 Preparación. Disolver los ingredientes y calentar a ebullición por 1 min. Distribuir en porciones de 5mL, en tubos con tapón de rosca, esterilizar por 15 min a 121°C y dejar solidificar en una superficie lo suficientemente inclinada para tener una profundidad de 3cm.

H.14.9 Regulador de fosfatos solución concentrada.

H.14.9.1 Fórmula.

KH ₂ PO ₄	34g
Agua destilada	500mL

H.14.9.2 Preparación: Solución concentrada: Disolver el fosfato en 500mL de agua y ajustar el pH a 7.2 ± 0.2, con solución de hidróxido de sodio 1.0N, llevar a 1L con agua y esterilizar durante 15 min a 121°C. Conservar en refrigeración.

Solución de trabajo: Tomar 1.25mL de la solución concentrada y llevar a 1L con agua. Distribuir en porciones de 99mL, 90mL y 9mL según se requiera. Esterilizar a 121°C durante 15 min. Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales.

H.14.10 Diluyente de peptona al 0.1%.**H.14.10.1 Fórmula.**

Peptona	1g
Agua destilada	1000mL
pH: 7.0 ± 0.2	

H.14.10.2 Preparación: Disolver la peptona en el agua destilada y esterilizar a 121°C por 15 min.

H.14.11 Reactivo de Kovac.**H.14.11.1 Fórmula.**

p-dimetilaminobenzaldehído	5g
Alcohol amílico (normal)	75mL
HCl concentrado	25mL

H.14.11.2 Preparación: Disolver el p-Dimetilaminobenzaldehído en alcohol amílico normal, adicionar lentamente el HCl. Almacenar a 4°C.

H.14.12 Reactivo de VP.**H.14.12.1 Fórmula.**

Solución 1.

alfa-naftol	5g
Alcohol Absoluto	100mL

Solución 2.

KOH	40g
Agua destilada	Para llevar a 100mL

H.14.12.2 Preparación: Disolver el alfa-naftol en 100mL del alcohol absoluto; para la solución 2, disolver el KOH en 100mL de agua destilada.

H.14.13 Indicador rojo de metilo.**H.14.13.1 Fórmula.**

Rojo de metilo	0.10g
Etanol al 95%	300mL
Agua destilada	Para completar 500mL

H.14.13.2 Preparación: Disolver el rojo de metilo en 300mL de etanol y aforar a 500mL con agua destilada.

H.14.14 Reactivos para la coloración de Gram.**H.14.14.1 Cristal Violeta.****H.14.14.1.1 Fórmula.**

Solución A.

Cristal violeta (colorante 90%)	2g
Etanol 95%	20mL

Solución B.

Oxalato de amonio	0.8g
Agua destilada	80mL

H.14.14.1.2 Preparación: Disolver el cristal violeta en 20mL del alcohol al 95%; para la solución 2, disolver el Oxalato de Amonio en 80mL de agua destilada. Mezclar la solución A y B y filtrar a través de un papel filtro. Almacenar por 24h.

H.14.14.2 Lodo.

H.14.14.2.1 Fórmula.

Iodo	1g
Ioduro de potasio (KI)	2g
Agua Destilada	300mL

H.14.14.2.2 Preparación: Colocar el KI en un mortero, adicionar el iodo, triturar con el pistilo por 5s a 10s, adicionar 1mL de agua y triturar. Adicionar 5mL de agua y triturar. Adicionar 10mL de agua y triturar. Vaciar esta solución en una botella de reactivo, enjuagar el mortero y el pistilo con la cantidad de agua necesaria para completar 300mL.

H.14.14.3 Colorante de contraste (solución concentrada).

H.14.14.3.1 Fórmula.

Safranina	2.5g
Etanol al 95%	100mL

H.14.14.3.2 Preparación: Solución de trabajo: Adicionar 10mL de la solución concentrada a 90mL de agua destilada.

H.14.15 Caldo Lactosa Bilis Verde Brillante.

H.14.15.1 Fórmula.

Ingredientes	Cantidades
Peptona	10.0g
Lactosa	10.0g
Sales biliares	20.0g
Verde Brillante	0.0133g
Agua	1L

H.14.15.2 Preparación: Disolver los ingredientes en el agua, calentar si es necesario. Ajustar el pH, de tal manera que después de la esterilización sea 7.0 ± 0.2 a 25°C . Distribuir el medio en frascos de capacidad necesaria. Esterilizar en autoclave 15 min a 121°C .

Apéndice I normativo.

Método aprobado para la estimación de la densidad de *E. coli* por la técnica del NMP, para productos de la pesca.

Este método es aplicable para pescados y productos de la pesca como: pescados crudos, enteros o filetes sin piel y cabeza, pescado salado, seco, ahumado, cefalópodo entero o en rebanada, crustáceos entero como langostas, cangrejo, gasterópodos, bivalvos, caracoles, procesados pescados y crustáceos moluscos como: secos, ahumados, marinados, troceado, horneado, pescado entero o filetes con o sin piel cocidos, surimi, crustáceos enteros y moluscos en su concha, congelados, pescado, entero, filetes y piezas, cangrejo, cefalópodos, moluscos en concha cocidos y caracoles en concha.

I.1 INTRODUCCIÓN.

Este método consta de dos etapas. La primera es un enriquecimiento mediante la inoculación de la muestra previamente homogeneizada y diluida en cinco tubos por dilución, en caldo glutamato con minerales modificado e incubado a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24h. La segunda es la confirmación de la presencia de *E. coli* mediante la resiembra de tubos en los que se observe producción de ácido en agar que contenga 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D glucuronido y detectar la actividad de β -glucuronidasa incubado a $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $22\text{h} \pm 2\text{h}$.

I.2 EQUIPO.

- I.2.1 Homogeneizador peristáltico y bolsas;
- I.2.2 Motor homogeneizador rotatorio y vasos de licuadora;
- I.2.3 Gabinete de flujo laminar (clase II);
- I.2.4 Refrigerador a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$;
- I.2.5 Material de vidrio estéril;
- I.2.6 Cuchillos desconchadores, tijeras, pinzas, espátulas estériles;
- I.2.7 Mechero Bunsen;
- I.2.8 Guantes de látex;
- I.2.9 Incubadora a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y a $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- I.2.10 Asas bacteriológicas;
- I.2.11 Pipetas de 1mL, 2mL y 10mL;
- I.2.12 Martillo, y
- I.2.13 Desconchador.

I.3 MATERIALES.

- I.3.1 Cajas Petri desechables 15mm x 100mm;
- I.3.2 Tubos de ensaye 18mm x 200mm y de 16mm x 160mm con tapón de rosca;
- I.3.3 Botellas de dilución de vidrio de borosilicato con tapa de rosca;
- I.3.4 Botellas de 500mL esterilizables;
- I.3.5 Termómetros de máximas cuya precisión/exactitud no sea mayor a 1°C . Se deberá registrar la inspección trimestral de la columna de mercurio del termómetro con una lupa en búsqueda de rupturas de la misma, si se observa alguna, éste deberá salir de uso, y
- I.3.6 Termómetro de inmersión total de 379mm de longitud de 25°C a 55°C , una escala auxiliar a 0°C con subdivisiones de 0.1°C con una precisión y exactitud de $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$.

Se deberá registrar la inspección anual de la columna de mercurio del termómetro con una lupa en búsqueda de rupturas de la misma, si se observa alguna, éste deberá salir de uso.

I.4 REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO.

- I.4.1 Etanol;
- I.4.2 Agua peptonada al 0.1% (concentración simple);
- I.4.3 MMGB medio selectivo de enriquecimiento;
- I.4.4 TBGA, y
- I.4.5 Tween 80.

I.5. CULTIVOS DE REFERENCIA.

- I.5.1 *E. coli* ATCC 25922 o ATCC 8739, y
- I.5.2 *E. faecalis* ATCC 29212 o ATCC 19433.

I.6 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

I.6.1 Procedimientos generales. Todas las preparaciones de las muestras deben llevarse a cabo en condiciones asépticas con materiales estériles y evitar contaminaciones de fuentes externas.

I.6.2 Productos congelados. Los productos congelados deben permitir que obtengan una consistencia adecuada para ser muestreados en el laboratorio, almacenados de 18°C a 27°C (temperatura del laboratorio) por máximo de 3h o a $2^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24h. Las muestras deben ser analizadas tan rápido como sea posible después de este paso. Si el producto todavía está congelado, tomar una porción del diluyente a temperatura del laboratorio y adicionar para facilitar la descongelación.

I.6.3 Productos secos y duros. No homogeneizar en un homogeneizador rotatorio por más de 2.5 min.

Para productos secos y duros heterogéneos, puede ser necesario picarlos o moler la muestra por no más de 2.5 min para evitar el aumento de temperatura.

I.6.4 Productos líquidos no viscosos. Antes de analizar la muestra agitar manualmente veinticinco veces en un arco de 30cm durante 7s o por medios mecánicos para asegurar la distribución homogénea de los microorganismos.

I.6.5 Productos heterogéneos. Para las muestras que contienen diferentes piezas de alimentos, muestrear varias alícuotas representativas de las diferentes porciones del producto. También se puede homogeneizar toda la muestra recibida en el laboratorio y tomar una porción analítica de este homogeneizado. Para lo cual puede ser necesario picar o moler por más de 1 min para evitar sobrecalentamiento de la muestra.

I.6.6 Productos ácidos. Cuando se analicen productos ácidos es necesario llevar el pH a la neutralidad. El uso de un diluyente con un indicador de pH puede evitar el uso de tiras reactivas de pH. Para lo cual es necesario adicionar NaOH (0.1Mplar) y ajustar cuando el indicador cambie de coloración.

I.6.7 Alimentos altos en grasa (aproximadamente sobre el 20% de grasa). Usar diluyente con Tween 80 entre 1 y 10mg/L de acuerdo al contenido de grasa mejora la emulsificación de la suspensión.

I.6.8 Pescado fresco entero. Las áreas de las branquias, el intestino y el ano deben ser cubiertas con algodón estéril empapado de alcohol al 70%. Tomar porciones cúbicas del músculo dorsal y moler con el diluyente.

I.6.9 Rebanadas y filete de pescado. Tomar una porción representativa de la muestra y diluir 1 + 9 de diluyente.

I.6.10 Cefalópodos enteros y en rebanadas. Remover la piel y las ventosas con pinzas y bisturí. Tomar porciones cúbicas del músculo dorsal y porciones de los tentáculos. Adicionar diluyente necesario para tener una dilución 1:10. La carne de los cefalópodos es relativamente firme, moler con el diluyente con homogeneizador rotatorio o cortar en piezas finas.

I.6.11 Crustáceos enteros como cangrejos. Utilizar martillo, pinzas para romper la concha y tenazas para extraer la cantidad máxima de carne para el análisis. Adicionar el diluyente y moler con homogeneizador rotatorio. Alternativamente se puede cortar en piezas finas y colocarlo en doble bolsa de homogeneizador peristáltico para evitar derrames durante la homogeneización.

I.6.12 Carne de crustáceo en concha. Tomar una porción necesaria para tener una suspensión 1:10 y homogeneizar.

I.6.13 Crustáceos como gambas, langostinos y langostas. Remover la cabeza y la cola antes del análisis de la carne del cuerpo. Excepto para animales pequeños cortar la carne en piezas. Homogeneizar en licuadora. Adicionar la cantidad necesaria de diluyente para tener una dilución 1:10.

I.6.14 Moluscos bivalvos, gasterópodos y otros. Las muestras en el laboratorio deben ser almacenadas a 4°C ±2°C. Los moluscos deben estar vivos. Desechar los moluscos con las conchas abiertas o dañadas. Una muestra representativa debe contener al menos 6 conchas individuales que deberán ser aproximadamente 75g a 100g (25g para animales pequeños). La muestra de bivalvos debe contener carne y líquido intervalvar (licor). Abrir la cantidad necesaria de moluscos para tener la cantidad suficiente de muestra para el método.

I.6.14.1 Bivalvos. Lavar y cepillar cada concha con agua potable corriente, especialmente del músculo abductor o bisagra. Colocar los bivalvos en una charola con un papel absorbente. Con un cuchillo desconchador estéril, insertar la punta entre las valvas y hacer palanca para cortar el músculo abductor y abrir la concha. Penetrar sobre la concha superior y drenar el licor y la carne en un vaso de precipitados estéril. Adicionar una parte de carne y licor (agua intervalvar) y dos partes de diluyente y homogeneizar en homogeneizador rotatorio por 30s a 2 min. De esta manera se obtiene una suspensión 1:2 de diluyente, puede adicionarse la cantidad necesaria para obtener una dilución 1:9.

I.6.14.2 Gasterópodos. Lavar y cepillar cada concha, lavarlas con alcohol al 70%, romper la concha con un martillo para extraer el animal. Preparar una dilución 1:2 en diluyente y posteriormente completar el volumen a una dilución 1:10.

I.6.14.3 Erizos de mar. Lavar seis piezas individualmente con agua potable corriente y colocarlos en una charola estéril. Sostener los animales con unas pinzas y con un guante apropiado cortar una pieza del lado ventral con unas tijeras afiladas. Colectar la carne y en fluido en un contenedor estéril para homogeneizarlo. Preparar una dilución 1:2 con diluyente y después una cantidad necesaria para tener una dilución 1 + 9 con el mismo diluyente.

I.6.15 Productos salados y encurtidos. Tomar tiras del producto para obtener el homogeneizado. En caso de que sea muy salado es necesario diluir más de 1:10.

I.6.16 Pescado seco. Con unas tijeras cortar piezas del cuerpo del pescado incluyendo la piel. Preparar 1 suspensión 1:2 con el diluyente y homogeneizar en un motor de licuadora, adicionar la cantidad suficiente para tener una dilución 1:10 usando el mismo diluyente.

I.6.17 Pescado seco y salado. Prepara la muestra igual que para el pescado seco. Si es necesario rehidratar la muestra con agitación por 60min de 18°C a 27°C.

I.6.18 Pescado ahumado entero. Si el pescado se come entero, incluir en la muestra la piel, si no se come entero excluir la piel.

I.6.19 Pescado ahumado en filetes o rebanadas con o sin piel. Tomar porciones en cubo de la muestra retirando la piel.

I.6.20 Productos marinados. Para productos acidificados bajar el pH a 6 – 7.

I.6.21 Pescados empanizados, surimi, crustáceos y moluscos delicatessen. Tomar porciones representativas de la muestra y diluir 1:10.

I.6.22 Platos con pescado, crustáceos y moluscos cocidos. Tomar una porción de cada componente. Homogeneizar toda la muestra para tomar una muestra analítica.

I.6.23 Gasterópodos cocidos. Tomar una porción del cuerpo del animal con pinzas y diluir 1:10.

I.6.24 Langostinos en concha congelados en bloque. Descongelar poco a poco por 1h a 18°C - 27°C (temperatura ambiente) para que el bloque se pueda romper, extraer los langostinos con pinzas estériles. Mezclar las piezas con un homogeneizador peristáltico.

I.6.25 Bloques congelados de carne de cangrejo en hojuelas. Descongelar poco a poco por 1h a 18°C - 27°C (temperatura ambiente) para que el bloque se pueda romper, extraer trozos con pinzas estériles. Mezclar con el diluyente con un homogeneizador rotario.

I.6.26 Cefalópodos enteros congelados en bloque. Descongelar poco a poco por 1h a 18°C -27°C (temperatura ambiente) para que el bloque se pueda romper, extraer con pinzas o tijeras estériles. Mezclar las piezas con un homogeneizador rotario.

I.6.27 Filetes de pescado congelado en bloques. Tomar una muestra perforando el bloque o permitir que se descongele de 18°C a 27°C por 1h y tomar porciones con pinzas estériles o dejar que se descongele lo suficiente por no más de 3h para tomar porciones con pinzas estériles.

I.6.28 Piezas grandes de pescado congelado en bloques. Descongelar poco a poco por 1h a 18°C - 27°C para que el bloque se pueda romper, rebanar con cuchillo bien afilado estéril por la mitad del bloque.

I.6.29 Porciones pequeñas de pescado congeladas individuales. Descongelar poco a poco por 1h a 18°C - 27°C (temperatura ambiente). Tratar la muestra como un producto fresco.

I.6.30 Atún entero congelado. Si el atún es descongelado tomar una pieza del músculo debajo de la piel usando un cuchillo estéril. Si el atún no se descongela usar un perforador. Pescado congelado y piezas de pescado congelado. Descongelar poco a poco por no más de 3h a 18°C -27°C (temperatura ambiente) o descongelar en el refrigerador de 0°C a 4°C por máximo de 48h o tomar piezas con un perforador evitando los huesos si es posible.

I.6.31 Preparación de diluciones decimales. Transferir 1mL de la suspensión inicial a un tubo con 9mL de diluyente estéril.

NOTA: Si es necesario tener un volumen más grande de la suspensión inicial (más de 1mL) adicionar nueve partes del diluyente empleado. Introducir la pipeta no más de 1cm de profundidad. Utilizar una pipeta para cada dilución. Mezclar perfectamente entre cada dilución preferentemente usando un agitador mecánico para obtener una dilución 10^{-2} . Si es necesario repetir la operación con una pipeta nueva diferente para obtener 10^{-3} , 10^{-4} etc. hasta obtener la dilución apropiada y obtener la cantidad de microorganismos necesaria. Se deberán realizar suficientes diluciones decimales para obtener resultados negativos.

I.6.32 Duración del proceso. El tiempo inicial entre la preparación de la suspensión y el momento final cuando el inóculo entre en contacto con el medio no debe ser mayor a 45 min, mientras que el límite de tiempo entre la preparación de la suspensión inicial y el comienzo de las diluciones decimales siguientes no debe ser mayor a 30 min.

I.7 MEDIOS DE CULTIVO.

I.7.1 Agua peptonada al 0.1% (concentración simple);

I.7.2 Caldo glutamato con minerales modificado (MMGB medio selectivo de enriquecimiento), y

I.7.3 Agar bilis glucuronido (TBGA sundo medio selectivo).

I.8 PROCEDIMIENTO, INOCULACIÓN DEL ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO.

I.8.1 En caso general inocular tres tubos por cada dilución. Para moluscos vivos, u otros productos especiales y/o cuando sea necesario obtener resultados más exactos es necesario inocular series de cinco tubos por dilución. Tomar tres tubos de medios de enriquecimiento selectivo. Con una pipeta estéril transferir 10mL de la muestra líquida o 10mL de la suspensión original en caso de otros productos. Tomar tres tubos de concentración simple de medios de enriquecimiento selectivo, usando otra pipeta estéril, transferir a cada uno de estos tubos 1mL de la muestra líquida o 1mL de la suspensión en caso de otros productos. Realizar diluciones decimales y repetir los puntos anteriores para cada dilución. Mezclar cuidadosamente el inóculo y el medio.

I.8.2 Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 2\text{h}$.

I.8.3 Para cada tubo inoculado que muestre presencia coloración amarilla estriar con un asa a una placa de agar triptona bilis glucuronido para obtener colonias aisladas.

I.8.4 Incubar las placas a $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 2\text{h}$.

I.8.5 Después del periodo de incubación, observar la presencia de colonias de cualquier tono azul (oscuro o pálido), indican la presencia de β -glucuronidasa positivo de *E. coli*.

I.9 INTERPRETACIÓN.

I.9.1 Considerar como positivo cada tubo del cual se obtengan colonias azules a azules-verdes en la placa del medio selectivo. Contar por cada dilución el número de tubos positivos en el medio.

I.10 EXPRESIÓN DE RESULTADOS.

I.10.1 Calcular el NMP a partir del número de tubos positivos por cada dilución consultando las Tablas I.1 o I.2 dependiendo de la serie de tubos que se utilice. Considerar la cantidad de gramos de muestra en cada dilución e informar por 100g de molusco o por g para productos de la pesca en general.

I.11 PRECISIÓN.

I.11.1 La técnica del NMP tiene amplias variaciones en los resultados en series de tres tubos por dilución. Por lo que los resultados obtenidos deben ser usados con precaución. Cuando se use las series de cinco tubos, se debe de reportar con la precisión obtenida la cual es comparable con los métodos de cuenta de colonias. Los límites de confianza se encuentran en las tablas (I.1, I.2).

Ejemplo.

Para una combinación de tubos positivos de 3-3-2 se tendría una lectura de 24NMP/g en un intervalo de confianza de 95% de 9.8 a 70 *E. coli* glucuronidasa positiva.

Para una combinación de tubos positivos de 5-2-1 se tendría una lectura de 70NMP/g en un intervalo de confianza de 95% de 22 a 170 *E. coli* glucuronidasa positiva.

I.12 INFORME DE PRUEBA.

I.12.1 El informe debe especificar:

I.12.1.1 Toda la información necesaria y completa para la identificación de la muestra;

I.12.1.2 El método de muestreo usado, si se conoce;

I.12.1.3 El método de prueba usado;

I.12.1.4 Todos los detalles no especificados en la técnica, y

I.12.1.5 Los resultados obtenidos y/o si la repetitividad se ha realizado.

Tabla I.1. Número más probable por gramo de muestra e intervalo de confianza del 95%, utilizando 3 tubos con 0.1, 0.01 y 0.001 g de muestra											
Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza	
0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.8	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.8	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

Tabla I.2. Número más probable por gramo de muestra e intervalo de confianza del 95%, utilizando 5 tubos con 0.1, 0.01 y 0.001 g de muestra

Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza	
0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior
0	0	0	<1.8	--	6.8	4	0	2	21	6.8	40
0	0	1	1.8	0.09	6.8	4	0	3	25	9.8	70
0	1	0	1.8	0.09	6.9	4	1	0	17	6	40
0	1	1	3.6	0.7	10	4	1	1	21	6.8	42
0	2	0	3.7	0.7	10	4	1	2	26	9.8	70
0	2	1	5.5	1.8	15	4	1	3	31	10	70
0	3	0	5.6	1.8	15	4	2	0	22	6.8	50
1	0	0	2	0.1	10	4	2	1	26	9.8	70
1	0	1	4	0.7	10	4	2	2	32	10	70
1	0	2	6	1.8	15	4	2	3	38	14	100
1	1	0	4	0.7	12	4	3	0	27	9.9	70
1	1	1	6.1	1.8	15	4	3	1	33	10	70
1	1	2	8.1	3.4	22	4	3	2	39	14	100
1	2	0	6.1	1.8	15	4	4	0	34	14	100
1	2	1	8.2	3.4	22	4	4	1	40	14	100
1	3	0	8.3	3.4	22	4	4	2	47	15	120
1	3	1	10	3.5	22	4	5	0	41	14	100
1	4	0	11	3.5	22	4	5	1	48	15	120
2	0	0	4.5	0.79	15	5	0	0	23	6.8	70
2	0	1	6.8	1.8	15	5	0	1	31	10	70
2	0	2	9.1	3.4	22	5	0	2	43	14	100
2	1	0	6.8	1.8	17	5	0	3	58	22	150
2	1	1	9.2	3.4	22	5	1	0	33	10	100
2	1	2	12	4.1	26	5	1	1	46	14	120
2	2	0	9.3	3.4	22	5	1	2	63	22	150
2	2	1	12	4.1	26	5	1	3	84	34	220
2	2	2	14	5.9	36	5	2	0	49	15	150
2	3	0	12	4.1	26	5	2	1	70	22	170
2	3	1	14	5.9	36	5	2	2	94	34	230
2	4	0	15	5.9	36	5	2	3	120	35	250
3	0	0	7.8	2.1	22	5	2	4	150	58	400
3	0	1	11	3.5	23	5	3	0	79	22	220
3	0	2	13	5.6	35	5	3	1	110	34	250
3	1	0	11	3.5	26	5	3	2	140	52	400
3	1	1	14	5.6	36	5	3	3	180	70	400
3	1	2	17	6	36	5	3	4	210	70	400
3	2	0	14	5.7	36	5	4	0	130	36	400
3	2	1	17	6.8	40	5	4	1	170	58	400
3	2	2	20	6.8	40	5	4	2	220	70	440
3	3	0	17	6.8	40	5	4	3	280	100	710
3	3	1	21	6.8	40	5	4	4	350	100	710
3	3	2	24	9.8	70	5	4	5	430	150	1100
3	4	0	21	6.8	40	5	5	0	240	70	710
3	4	1	24	9.8	70	5	5	1	350	100	1100
3	5	0	25	9.8	70	5	5	2	540	150	1700
4	0	0	13	4.1	35	5	5	3	920	220	2600
4	0	1	17	5.9	35	5	5	4	1600	400	4600
						5	5	5	>1600	700	--

I.13. MEDIOS DE CULTIVO.**I.13.1** Agua peptonada al 0.1% (concentración simple).

Peptona bacteriológica (Oxoid LPP37)

1.0±0.1g

Agua deionizada

1L

pH

7.0 ± 0.2

I.13.1.1 Preparación: Suspender los ingredientes en 1L de agua destilada. Dejar en reposo durante 5 min a 10 min. Mezclar bien, agitando frecuentemente, hasta completar la disolución. Ajustar el pH.

I.13.2 Caldo glutamato con minerales modificado (MMGB medio selectivo de enriquecimiento).

Ingredientes	Doble concentración	Concentración simple
Glutamato de sodio (Oxoid L124)	12.7g	6.35g
Lactosa	20.0g	10.0g
Formato de sodio	0.5g	0.25g
L-Cisteína	0.04g	0.02g
L(-) Acido aspártico	0.048g	0.024g
L(+) - Arginina	0.04g	0.02g
Tiamina	0.002g	0.001g
Ácido nicotínico	0.002g	0.001g
Ácido pantogénico	0.002g	0.001g
Sulfato de magnesio septahidratado	0.2g	0.1g
Citrato de fierro III	0.02g	0.01g
Cloruro de calcio dihidratado	0.02g	0.01g
Fosfato dipotásico	1.8g	0.9g
Púrpura de bromocresol	0.02g	0.01g
Cloruro de amonio	5.0g	2.5g
Agua destilada	1000mL	1000mL

I.13.2.1 Preparación: Disolver el cloruro de amonio en agua. Adicionar el resto de los componentes hasta su completa disolución y calentar si es necesario. Para mejorar la estabilidad del almacenamiento del medio. Adicionar el glutamato de sodio por separado. Ajustar el pH si es necesario, así como después de la esterilización el cual debe de ser de 6.7 ± 0.1 a 25°C. Distribuir el medio en volúmenes de 10mL en caso de concentración simple y tubos de 22mm x 175mm para el caso de concentración doble de medio. Esterilizar en autoclave a 116°C. Alternativamente calentar a 100°C por 30 min en 3 días sucesivos.

I.13.3 Agar bilis glucuronido (TBGA segundo medio selectivo).

Digerido enzimático de caseína	20.0g
Sales biliares No.3	1.5g
5-Bromo-4-cloro-3-Indol- β -D- glucuronido ácido (BCIG)	144 μ mol (micro mol) ^a
Dimetil sulfoxido (DMSO) ^b	3mL
Agar	9g ^c a 18g ^c
Agua	1000mL

a Por ejemplo 0.075g de

b Dimetil sulfoxido es peligroso al inhalarlo y al contacto. Se recomienda el uso de cubrebocas para humos y equipo de protección apropiado para manejar este reactivo.

c Depende de la concentración del gel el agar.

I.13.3.1 Preparación: Disolver el medio anterior en el dimetil sulfoxido. Disolver todos los componentes en aguas calentando a ebullición. Ajustar el pH si es necesario, así como después de la esterilización el cual debe de ser de 7.2 ± 0.2 a 25°C. Esterilizar el medio a 121°C por 15 min. Vaciar de 12mL a 15mL en placas Petri estériles y dejar secar. Las placas pueden ser almacenadas a entre 3°C y 5°C hasta 5 días. El agar debe estar lo suficientemente seco para permitir que el exceso de humedad desaparezca dentro de los 15 min después de extender el inóculo.

Apéndice J Normativo.**Método para la Enumeración de *E. coli* β -glucuronidasa a 44°C utilizando 5-Bromo-4-cloro-3-Indol β -D-Glucurónido.**

ADVERTENCIA - Las cepas de *E. coli*, que no crecen a 44°C y en particular, los que son β -glucuronidasa negativas, como *E. coli* O:157, no serán detectadas.

J.1. INTRODUCCIÓN.

El medio TBX presenta la ventaja con respecto a otros medios de cultivo, al haber adicionado un agente cromógeno X-glucurónido, el cual detecta la actividad de la enzima glucuronidasa que es altamente específica de *E. coli*. Al contrario de lo que sucede con el MUG en donde el fluoróforo liberado por la célula queda atrapado dentro del agar y es requisito evidenciarlo con ayuda de luz UV de onda larga (365nm), la liberación del cromóforo en el medio TBX es insoluble y se acumula dentro de la misma célula. Esto asegura que sea más fácil la detección de colonias típicas de *E. coli* debido a que adquieren cierta coloración característica. La mayoría de los biotipos de *E. coli*, se podrán diferenciar de otros coliformes, debido a la presencia de la enzima glucuronidasa.

El cromógeno en el medio TBX es el 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucurónido (X-glucurónido), y es el blanco de esta enzima. Las células de *E. coli* son capaces de absorber este complejo intacto y la glucuronidasa intracelular rompe los enlaces entre el cromóforo y la glucuronidasa. El cromóforo liberado tiene un color propio y se queda atrapado dentro de la célula, provocando que las colonias de *E. coli* se observen de color azul sin la necesidad de interpretar con iluminación de luz UV de onda larga.

J.2 EQUIPO:

J.2.1 Incubadora capaz de operar a 44°C $\pm$ 1°C;

J.2.2 Baño de agua capaz de mantener una temperatura de 44°C a 47°C;

J.2.3 Incubadora capaz de operar a 35°C $\pm$ 2°C, y

J.2.4 Homogeneizador peristáltico o licuadora.

J.3 MATERIALES:

J.3.1 Tubos de Ensaye;

J.3.2 Matraces;

J.3.3 Botellas;

J.3.4 Micropipetas y Pipetas de 1mL, 10mL graduadas respectivamente en 0.1mL y 0.5mL, y

J.3.5 Cajas Petri de aproximadamente 90mm de diámetro.

J.4 MEDIOS DE CULTIVO.

J.4.1 TBX.

J.5 CONDICIONES DE PRUEBA.**J.5.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE ENSAYO.**

J.5.1.1 Tomar diferentes porciones del alimento, transferir 25g o mL a frascos de dilución conteniendo 225mL de agua peptonada amortiguada. Realizar diluciones seriadas si es necesario. En una situación atípica y justificada, si la porción de muestra utilizada en el ensayo es distinta a 25g o mL, se deberá utilizar la cantidad necesaria de agua peptonada amortiguada para obtener una dilución 1:10.

J.5.1.2 Dependiendo de la naturaleza del producto homogenizar por 1 min o 2 min en Licuadora o agitador peristáltico.

J.5.1.3 El tiempo que transcurre entre el final de la preparación de la suspensión inicial y el momento en que el inóculo entra en contacto con el medio de cultivo no debe exceder de 45min.

J.5.2 INOCULACIÓN E INCUBACIÓN.

J.5.2.1 Utilizando una pipeta estéril o micropipeta con puntas estériles, transferir por duplicado a placas Petri 1mL de la muestra (muestras líquidas) o 1mL de cada dilución preparada. Inocular por duplicado en cajas Petri.

J.5.2.2 Adicionar en cada caja Petri aproximadamente 15mL del medio TBX previamente fundido y mantenido en un baño de agua entre 40°C y 50°C.

J.5.2.3 Homogenizar el inóculo mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio. Dejar solidificar.

Nota: El tiempo que transcurre entre el inóculo en la caja Petri y adicionar el medio de cultivo no debe exceder de 15 min.

J.5.2.4 Invertir las placas e incubar por un periodo inicial de 4h a 35°C ± 2°C e incubar inmediatamente a 44°C ± 1°C durante 18h a 20h. El tiempo total de incubación no debe exceder 24h.

Nota: La temperatura de incubación no debe exceder 45°C.

J.6 CUENTA DE UFC.

Después del periodo de incubación contar las colonias típicas como β-glucuronidasa positiva, colonias azules.

J.7 EXPRESIÓN DE RESULTADOS.**J.7.1 CÁLCULOS.**

Nota: Para que el resultado sea válido, es necesario que al menos una de las placas contadas tenga 15 UFC típicas (Colonias azules).

Seleccionar las placas que contienen menos de 150 UFC típicas (*E. coli* β-glucuronidasa positiva) y en total no tener más de 300 UFC (típicas y no típicas).

Calcular N, como el número de UFC de *E. coli* β-glucuronidasa positiva, presente en la muestra por mL o g, como la media de dos diluciones sucesivas utilizando la siguiente ecuación:

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0.1 n_2) d}$$

Dónde:

$\sum a$ = Es la suma de las UFC contenidas en todas las placas por duplicado, donde al menos una cumpla con el criterio de tener 15 colonias típicas.

n_1 = Es el número de placas inoculadas para la primera dilución.

V = Es el volumen del inóculo, en mL, inoculados en cada Placa Petri.

n_2 = Es el número de placas inoculadas para la segunda dilución.

d = Es el factor de dilución correspondiente a la primera dilución (d= 1 en el caso de productos líquidos, donde la muestra es directamente inoculada)

Redondear el resultado a números enteros utilizando dos cifras significativas.

Tomar el número resultante como las UFC de *E. coli* β-glucuronidasa positiva, por mL o por g de producto.

Ejemplo: Se analizó fruta picada para la búsqueda de *E. coli* β-glucuronidasa positiva. Se obtienen los siguientes resultados:

Dilución	Colonias contadas en Placa "a"	Colonias contadas en Placa "b"
1:10	125	109
1:100	21	16

Aplicando la fórmula anterior y sustituyendo los valores se obtiene:

$$N = \frac{125 + 109 + 21 + 16}{1 [2 + (0.1)(2)] 0.1}$$

$$N = \frac{271}{0.22} = 1231 \approx 1200 \text{ FC/g de } E. coli \beta\text{-glucuronidasa positiva.}$$

Nota: Redondear a 2 cifras significativas.

J.7.2 ESTIMACIÓN DE NÚMEROS BAJOS.

J.7.2.1 Si las placas Petri contienen menos de 15 colonias típicas, calcular el N_E el número de UFC de *E. coli* β -glucuronidasa positiva presente en la muestra, como la media aritmética de dos placas paralelas utilizando la siguiente ecuación:

$$N_E = \frac{\sum c}{(V)(n)(d)}$$

Dónde:

$\sum c$ = Es la suma de las UFC típicas de las dos placas.

V = es el volumen del inóculo, en mL para cada placa.

n = es el número de placas Petri utilizadas en el recuento ($n=2$ en este caso).

d = es el factor de dilución de la suspensión inicial o la primera dilución inoculada ($d = 1$ en el caso de productos líquidos) donde la muestra es inoculada directamente.

Redondear el resultado a dos cifras significativas.

Expresar los resultados como sigue:

- Número estimado de UFC *E. coli* β -glucuronidasa positiva por mL o g.

Ejemplo: En un brote alimenticio se analizó carne de hamburguesa mal cocida para la búsqueda de *E. coli* β -glucuronidasa positiva. Se obtienen los siguientes resultados.

Dilución	Colonias contadas Placa "a"	Colonias contadas Placa "b"
1:10	5	7

Aplicando la fórmula anterior y sustituyendo los valores se obtiene:

$$N_E = \frac{5+7}{(1\text{mL})(2)(0.1)} = \frac{12}{0.2} = 60 \text{ UFC/g}$$

Reportar como:

60* UFC/g de *E. coli* β -glucuronidasa positiva.

* Valor estimado.

J.7.2.2 Si dos placas inoculadas directamente con la muestra de prueba o con la dilución inicial; no se observa crecimiento de colonias azules; expresar los resultados como sigue:

- Menos que $1/d$ de *E. coli* β -glucuronidasa positiva por mL o g.

Donde d es el factor de dilución de la dilución inicial ($d=1$ en el caso de productos líquidos los cuales son inoculados directamente en la caja Petri).

Por ejemplo: si no se encuentran colonias en ninguna dilución y la primer dilución es 1:10 entonces reportar como menos que $1/0.1$ es decir < 10 UFC g o mL de *E. coli* β -glucuronidasa positiva.

J.7.2.3 Si la cuenta de colonias típicas y atípicas en la primera dilución es mayor de 300, pudiendo discernir colonias azules y en la siguiente dilución la cuenta de típicas y atípicas es menor de 300 colonias sin ninguna colonia típica azul, expresar los resultados como sigue:

- Menor que $1/d_2$ y mayor que $1/d_1$ *E. coli* β -glucuronidasa positiva por mL o g. Donde d_1 y d_2 son los factores de dilución correspondientes a los factores de dilución de la primera y segunda dilución respectivamente.

Por ejemplo: En la dilución 1:10 se cuenta más de 300 colonias y se observan algunas colonias azules, y en la segunda dilución (1:100) se cuentan 33 colonias pero ninguna colonia típica azul.

Entonces se tiene $< 1/0.01$ y $> 1/0.1$ por lo tanto: $< 100\text{UFC/g}$ y $> 10\text{UFC/g}$ de *E. coli* β -glucuronidasa positiva.

J.7.2.4 Si en la primera dilución d_1 el total de colonias típicas y atípicas es mayor de 300 sin discernir colonias azules y para la subsecuente dilución d_2 contiene menos de 300 colonias sin poder contar alguna colonia azul, expresar los resultados como sigue:

- Menos que $1/d_2$ UFC *E. coli* β -glucuronidasa positiva por mL o g.

Dónde: d_2 es el factor de dilución correspondiente a la segunda dilución.

Por ejemplo: Para la dilución 1:10 se cuentan más de 300 colonias de las cuales no se distinguen las colonias típicas de las atípicas y en la dilución 1:100 se cuentan 35 colonias; sin ninguna colonia típica azul.

Entonces se tiene $< 1/1:100$ por lo tanto reportar como: < 100 UFC/g o mL de *E. coli* β -glucuronidasa positiva.

J.7.3 CALCULOS PARA CASOS ESPECIALES.

J.7.3.1 En el caso donde el número de UFC típicas azules es mayor de 150 para el duplicado de la primera dilución d_1 y con un número menor de 15 UFC para el duplicado de la segunda dilución d_2 :

- Si la cuenta de UFC típicas azules en cada uno de los duplicados de la primer dilución se encuentra dentro del rango de 150 a 167 (siendo el límite superior del intervalo de confianza de una media igual a 150), utilizar la fórmula del caso J.7.1:
- Si la cuenta de colonias típicas azules en cada una de las placas por duplicado de la dilución d_1 es mayor que 167 (siendo el límite superior del intervalo de confianza de una media igual a 150), se TOMARÁ EN CUENTA SÓLO el resultado de las cuentas de d_2 (la mayor dilución) y aplicar la fórmula para cuentas bajas del punto J.7.2.

J.7.3.2 En el caso donde la cuenta de colonias típicas azules en cada una de las placas, de cada dilución sea mayor a 150, expresar el resultado como sigue:

- Mayor que $150/d_2$ *E. coli* β -glucuronidasa positiva/mL o g.

Donde d_2 es el factor de dilución para la última dilución inoculada (la mayor dilución).

Por ejemplo:

Dilución 1:10

Placa 1: >150 colonias típicas azules Placa 2: >150 colonias típicas azules.

Dilución 1:100

Placa 1: 162 colonias típicas azules Placa 2: 186 colonias típicas azules

Entonces se tiene $> 150\text{UFC}/0.01$ por lo tanto reportar como:

$> 15\ 000\text{UFC/g}$ o mL de *E. coli* β -glucuronidasa positiva.

* Valor estimado

J.7.3.3 En el caso donde sólo el duplicado dé la más baja dilución (o alta concentración de muestra) contiene menos de 150 colonias típicas azules, calcular el número de *E. coli* β -glucuronidasa positiva presente en la muestra de prueba como la media aritmética del total de colonias de las dos placas, utilizando la siguiente ecuación:

$$N' = \frac{\Sigma c}{(V)(n)(d)}$$

Donde:

$\sum C$ = Es la suma de las UFC típicas de las dos placas, de las cuales al menos una contiene 15 UFC típicas.

V = Es el volumen del inóculo, en mL para cada placa.

n = Es el número de placas Petri utilizadas en el recuento ($n=2$ en este caso).

d = Es el factor de dilución de la suspensión inicial o la primera dilución inoculada.

Redondear el resultado a dos cifras significativas.

Por ejemplo:

10^{-1} = Placa 1: 85 colonias Placa 2: 76 colonias

10^{-2} = Placa 1: 0 colonias Placa 2: 0 colonias

$$N' = \frac{85+76}{(1\text{mL}) (2)(0.1)}$$

$N' = 161/0.2 = 805\text{UFC/g} \approx 800 \text{ UFC/g de } E. coli \beta\text{-glucuronidasa positiva.}$

J.8 FORMULACIONES Y PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

J.8.1 TBX.

J.8.1.1 Composición.

Digerido Enzimático de Caseína (Tryptona)	20.0g
Sales biliares no. 3.	1.5g
X-glucuronido	0.075g
Agar	de 9g a 18g ^a
Agua	1000mL

^a Dependiendo de la fuerza del agar.

J.8.1.2 Preparación.

Disolver el X-glucuronido en el diluyente recomendado por el fabricante. Disolver todos los componentes en agua y calentar a ebullición.

Ajustar el pH, si es necesario, para que después de la esterilización éste se encuentre en 7.2 ± 0.2 a 25°C .

Esterilizar el medio en la autoclave a 121°C por 15min. Inmediatamente enfriar el medio en un baño de agua mantenido de 44°C a 47°C .

J.8.2 AGUA PEPTONADA AMORTIGUADA

J.8.2.1 Fórmula.

Digerido enzimático de caseína (triptona)	10.0g
NaCl	5.0g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	9.0g
KH_2PO_4	1.5g
Agua	1 000mL

J.8.2.2 Preparación: Disolver los ingredientes en el agua, calentar si es necesario. Ajustar el pH, de tal manera que después de la esterilización sea 7.0 ± 0.2 a 25°C . Distribuir el medio en frascos de capacidad necesaria para obtener las porciones de prueba. Esterilizar en autoclave 15 min a 121°C .

