

PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-210-SSA1-2013, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos y toxinas microbianas.

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

MIKEL ANDONI ARRIOLA PEÑALOSA, Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39, fracción XXI, de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4o., de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 3o., 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, 47, fracción I y 52, de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 28 y 33, del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 4o., 15 y Quinto Transitorio, del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios; 2o., Apartado C, fracción X y 36, del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud, y 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; he tenido a bien ordenar la publicación en el Diario Oficial de la Federación del Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-210-SSA1-2013, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos y toxinas microbianas.

El presente proyecto se publica a efecto de que los interesados, dentro de los siguientes 60 días naturales, contados a partir de la fecha de su publicación, presenten sus comentarios por escrito, en idioma español y con el sustento técnico suficiente ante el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, sito en Oklahoma No. 14, colonia Nápoles, Delegación Benito Juárez, código postal 03810, México, Distrito Federal, teléfono 5080 5200, extensión 1333, fax 5511 1499, correo electrónico rfs@cofepris.gob.mx.

Durante el plazo mencionado, los documentos que sirvieron de base para la elaboración del proyecto estarán a disposición del público para su consulta en el domicilio del Comité.

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 de Análisis de Riesgo del Distrito Federal.

Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Chiapas.

Laboratorio Estatal de Salud Pública de Tamaulipas.

Laboratorio Estatal de Salud Pública Coahuila.

Laboratorio Estatal de Salud Pública de Jalisco.

Laboratorio Estatal de Salud Pública de Tlaxcala.

Laboratorio Estatal de Salud Pública de Nayarit.

Laboratorio Estatal de Salud Pública de Sonora.

Laboratorio Estatal de Salud Pública de Sinaloa.

SERVICIOS DE SALUD DEL ESTADO DE PUEBLA.

Subdirección de Servicios Auxiliares de Diagnóstico y Tratamiento de los Servicios de Salud del Estado de Puebla.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

Facultad de Química.

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.

Laboratorio de Investigación y Asistencia Técnica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.

Facultad de Ciencias Biológicas.

CÁMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE LA LECHE.

Organismo Nacional de Normalización de Productos Lácteos, A.C.

RED DE TERCEROS AUTORIZADOS.

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

Laboratorio de Especialidades Inmunológicas, S.A. de C.V.

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

Centro Estatal de Laboratorios.

Laboratorios Valdés, S.A. de C.V.

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

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

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

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

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

Laboratorios de Especialidades Inmunológicas, S.A. de C.V.

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

Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos.

Laboratorio Bio-Tekax.

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

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

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

ÍNDICE

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

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

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

Apéndice Normativo C. Método de referencia para el aislamiento *Listeria monocitogenes*.

Apéndice Normativo D. Método aprobado para el recuento de Enterococos en agua.

Apéndice Normativo E. Método de referencia "Sustrato fluorogénico para determinar enterococos en agua".

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

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

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

Apéndice normativo I. Método aprobado para la estimación de la densidad de *Escherichia coli* por la técnica del número más probable, para productos de la pesca.

1. Objetivo y campo de aplicación.

1.1. Esta Norma tiene por objeto establecer los métodos generales de prueba y alternativos para la determinación de los siguientes indicadores microbianos y patógenos en alimentos y agua para uso y consumo humano que no cuentan con una norma específica de producto:

Salmonella spp.

- Apéndice Normativo A.

Staphylococcus aureus.

- Apéndice Normativo B.

Listeria monocitogenes

- Apéndice Normativo C.

Enterococos.

- Apéndice Normativo D.

- Apéndice Normativo E.

- Apéndice Normativo F.

- Apéndice Normativo G.

Coliformes.

- Apéndice Normativo H.

Escherichia coli.

- Apéndice Normativo H.

- Apéndice Normativo I.

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 numeral anterior en alimentos para consumo nacional o de importación.

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. *Clostridium botulinum*: al bacilo Gram positivo, anaerobio y formador de esporas, productor de una potente neurotoxina. Según la especificidad antigénica de la toxina producida por cada cepa, se conocen siete tipos diferentes: A, B, C, D, E, F y G.

3.2. Coliformes: a los bacilos Gram negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos que a 32-35°C fermentan la lactosa con formación de ácido y gas en un tiempo no mayor a 48 h.

3.3. Coliformes fecales: a los bacilos cortos Gram negativos, anaerobios facultativos, que fermentan la lactosa con producción de ácido y de gas a 45,5 ± 0,2°C en 24 a 48 h.

3.4. *Escherichia 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. 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. Produce ácido en agar que contenga 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D glucuronido y es β -glucuronidasa positivo incubado a $44\pm 1^\circ\text{C}$ por $22\pm 1^\circ\text{C}$.

3.5. Enterococos intestinales: al subgrupo de los *Streptococcus* que incluye *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Enterococcus durans* y *Enterococcus hirae*. Son 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 .

3.6. Colonias: al agrupamiento de células en forma de masas visibles, en un medio sólido que provienen teóricamente de una sola célula.

3.7. Dilución primaria: 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.

3.8. 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.

3.9. Hemólisis: a la zona transparente alrededor de la colonia debida a la lisis total del eritrocito.

3.10. Levaduras: a los microorganismos cuya forma dominante de crecimiento es unicelular, no suelen formar filamentos. Poseen un núcleo definido y se multiplican por reproducción sexual o asexual, por gemación o por fisión transversal. La reproducción sexual cuando ocurre, es por medio de ascosporas contenidas en un saco o asca. Típicamente exhiben forma oval y algunas especies son cromógenas.

3.11. *Listeria monocytogenes*: al bacilo corto, Gram positivo, no esporulado, móvil, aerobio facultativos, β -hemolítico, catalasa positivo, oxidasa negativo, capaz de crecer en condiciones de microaerofilia.

3.12. Métodos de referencia: a los métodos utilizados en casos de controversia nacional o internacional y en ausencia de un método aprobado.

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

3.14. Métodos alternativos aprobados: a los métodos 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.

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

3.16. Mohos: al grupo de hongos microscópicos; organismos pertenecientes al reino *Fungí*, que se caracterizan por estar formados de una estructura filamentosa con ramificaciones que se conocen con el nombre de hifas, el conjunto de hifas constituye el micelio, carecen de clorofila, se alimentan por absorción pudiendo propagarse por esporas o no, las paredes celulares pueden ser de queratina, celulosa o manana. Crecen formando colonias en un medio selectivo a 25 - 28°C .

3.17. Micrococcus: al género de bacterias Gram-positivas con células esféricas de diámetro comprendido entre $0,5$ y 3 micrómetros que típicamente aparecen en tétradas. *Micrococcus* tiene una gruesa pared celular que puede abarcar tanto como el 50% del materia celular. Su genoma es rico en guanina y citosina (GC), típicamente en porcentaje del 65 al 75% de contenido Guanin-Citocina.

3.18. Muestra: al número de unidades tomadas de un lote, que han sido seleccionadas en forma aleatoria y cuyas características son lo más similar posible a las del lote que procede.

3.19. Patógeno: al microorganismo capaz de producir una enfermedad.

3.20. Psicófilico: al microorganismo que exhibe una temperatura óptima de crecimiento a 5 - 7°C como máximo. Tiene la capacidad de crecer a 0°C .

3.21. Psicrotrófico: al microorganismo que exhibe una temperatura óptima de crecimiento inferior a 20°C, pero que puede desarrollarse a temperaturas de refrigeración.

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

3.23. *Staphylococcus aureus*: a los cocos de 0,8 a 1,2µm, Gram positivo, anaerobio facultativo, no esporulado, inmóvil, catalasa positivo, capaz de producir toxinas y otras enzimas relacionadas con su patogenicidad.

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

3.25. Termofílico aerobio: al microorganismo capaz de crecer en presencia de oxígeno y cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra por encima de los 50°C.

3.26. Toxina: a la sustancia productora de efectos tóxicos secretada por las bacterias patógenas.

3.27. Unidades Formadoras de Colonias: al término que se utiliza para reportar la cuenta de colonias en placa, presuponiendo que cada colonia proviene de un solo microorganismo.

3.28. *Vibrio cholerae*: al bacilo Gram negativo, curvo, móvil, no esporulado, anaerobio facultativo, oxidasa positivo.

4. Símbolos y abreviaturas.

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

ABE	Agar Bilis Esculina.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ASB	Agar Sulfito de Bismuto.
ASPE	Agar Selectivo para Enterococos Pfizer.
AST	Agar Soya Trypticasa.
ATCC	Por sus siglas en inglés American Type Culture Collection.
AOAC Internacional	Por sus siglas en inglés Association of Analytical Communities.
AFNOR	Por sus siglas en francés Association Française de Normalisation.
β	Beta.
BHI	Caldo Infusión Cerebro Corazón.
Caldo A-1	Caldo de pre enriquecimiento para coliformes.
Caldo fraser	Caldo pre-enriquecimiento selectivo secundario.
Caldo fraser medio	Caldo pre-enriquecimiento selectivo primario.
CCAyAC	Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura.
CENAM	Centro Nacional de Metrología.
cm	centímetro.
CIP	Por sus siglas en inglés Culture International Production.
CODEX	Por sus siglas en inglés Codex Alimentarius, Internacional Food Standards.
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.
CST	Caldo Soya Trypticaseina.
CTSYE	Caldo Triptona Soya con Extracto de Levadura.
°C	grados Celsius.
°	grados.
EC	Caldo <i>E. coli</i> .
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .

<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> .
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> .
EH	Agar Entérico de Hektoen.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMB-L	Agar Azul de Metileno de Levin.
FDA	Por sus siglas en inglés Foods and Drugs Administration.
g	gramos
GUD	beta-glucuronidasa.
h	hora.
ISO	Por sus siglas en inglés International Organization for Standardization.
ICMSF	Por sus siglas en inglés International Commission on Microbiological Specifications for Foods.
IMViC	Indol, Rojo de metilo, voges Proskauer, citrato.
1/d	Inverso de la dilución.
KOH	Hidróxido de Potasio.
L	Litro.
±	más menos.
>	mayor.
<	Menor.
LIA	Agar hierro y lisina.
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> .
<i>L. innocua</i>	<i>Listeria innocua</i> .
<i>L. ivanovii</i>	<i>Listeria ivanovii</i> .
µm	micrómetro.
mL	mililitro.
mm	milímetro.
min	minuto.
MKTTn	Caldo de Muller-Kauffmann tetracionato novobiocina.
M	molar.
MMGB	Caldo Glutamato con Minerales Modificado.
MUG	4-metilumbelliferyl-beta-D-glucurónido.
MU	4-metilumbelliferona.
NaCl	Cloruro de Sodio.
Nm	nanómetro.
NCTC	Por sus siglas en inglés National Culture Type Collection.
N	Normal.
NMP	Número Más Probable.
ONPG	O-Nitrofenil β-D-galactopiranosido.
PALCAM	Medio PALCAM para determinar <i>Listeria</i> .
PBS	Solución Salina fosfatada amortiguada.
RM	Rojo metilo.

TBGA	Agar bilis glucuronido.
TSI	Agar triple azúcar y Hierro.
TSYA	Agar triptona soya con extracto de levadura.
/	por.
%	por ciento.
pH	potencial de Hidrógeno.
<i>R. Equi</i>	<i>Rhodococcus equi</i> .
Rpm	Revoluciones por minuto.
RVS	Medio de Rappaport-Vassiliadis con soya.
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> .
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> .
seg	segundo.
spp	especies plurales.
X	signo de multiplicación.
XLD	Agar Xilosa Lisina Desoxicolato.
UFC	Unidades Formadoras de Colonias.
UV	Ultravioleta.
VP	Voges – Proskauer.

5. Consideraciones Generales.

5.1. Los laboratorios de prueba que realicen estas determinaciones o análisis deberán cumplir con los requisitos establecidos en la NMX-EC-17025-IMNC-2006 o su versión vigente.

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 aprobación de los métodos que utilicen para fines de control, inspección o programa específico, la COFEPRIS, emitirá la autorización correspondiente en términos de las disposiciones jurídicas aplicables y 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>.

6. Equipos.

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

6.2. Los potenciómetros deben tener una precisión de verificación mínima de $\pm 0,1$ pH a 20°C – 25°C. Deben verificarse el día de uso con soluciones Buffer trazables al CENAM.

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 que pueden trabajar a los intervalos de temperatura indicados en los métodos, mediante un estudio de distribución, muestreando diferentes puntos de la cámara, durante un tiempo determinado, que asegure las condiciones de incubación de la prueba.

6.5. Cuando se indique el uso de un termómetro éste deberá estar dentro de un programa de calibración y verificación vigente.

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. Como con indicadores biológicos. Es recomendable que el laboratorio cuente con ciclos de esterilización validados, 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 ejemplo cuando se indique un variación de +/- 1°C, el termómetro deberá tener un 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 preparados en polvo o listos para su uso, siempre que éstos cumplan con la Formulación descrita en el método.

7.3. Debe realizarse control de calidad lote a lote de preparación. Como referencia para el control de calidad de los medios de cultivo pueden utilizarse las normas internacionales ISO 11133-1 e ISO 11133-2, los procedimientos recomendados por el fabricante o conforme a lo dispuesto en las "Guías para la evaluación de medios de cultivo para análisis microbiológicos", disponibles para su consulta en el portal de Internet <http://www.cofepris.gob.mx>. Para los medios de cultivo preparados el control de calidad debe realizarse por cada remisión entregada.

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

8. Cepas de referencia.

8.1. Las cepas control utilizadas deberán demostrar trazabilidad a una colección de microorganismos reconocida y deberá demostrar la pureza y viabilidad de las mismas.

9. Concordancia con normas internacionales.

Esta Norma es totalmente equivalente con las siguientes normas internacionales.

9.1. International Standard ISO 16649-3. Microbiological of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidasa *Escherichia coli* positive. Part 3 number technique using 5-bromo-4-choloro -3-indolyl - β -Dglucuronido. First edition (2005).

9.2. International Standard ISO 7899-2 Water quality. Detection and enumeration of intestinal enterococci. Part 2: Membrane filtration method. (04-2000).

9.3. International Standard ISO 8199 Water quality. General guidance on the enumeration of micro-organisms by cultura. (06-2005).

9.4. International Standard ISO 11290 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: Detection method. 1th Edition (1996).

9.5. International Standard ISO 6888. Microbiology – General guidance for enumeration of *Staphylococcus aureus* – colony count technique, 1th edition (05-1983).

9.6. International Standard ISO 6579 Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. 4th edition (2002).

10. Bibliografía.

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

10.2. Peter Feng, Stephen D. Weagant, Michael A. Grant. Bacteriological Analytical Manual, Chapter 4, Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria, marzo 2012. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>.

10.3. American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th edition Washington DC. (2001).

10.4. American Public Health Association. Recommended Procedures for the Examination of Seawater and shellfish. 4th edition. Washington DC. (1970).

10.5. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 16th edition. Washington DC. (1992).

10.6. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th edition. Washington DC. (1998).

10.7. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Manual of Food Quality Control Microbiological Analysis. 4 revisions (1992).

10.8. AOAC Official Methods of Analysis. Microbiological Methods. Capítulo 17. 18 ° Edición, (1995).

10.9. AOAC Official Methods of Analysis. Microbiological Methods. Capítulo 17. 18 ° Edición, (2007).

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

10.11. American Public Health Association Standard Methods For the examination Of Water & Wastewater, Membrane Filter Techniques. 21th edition. Washington DC. (2005).

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

10.13. World Health Organization. Guidelines for Drinking-water Quality. Vol. 1, 3th Edition.

10.14. ASTM International Standard Test Method for Enterococci in water using Enterolert. D6503-99 (2009).

10.15. EPA US Method 1600: Enterococci in Water by Membrane Filtration Using membrane-Enterococcus Indoxyl-β-D-Glucoside Agar (mEI) (September 2002).

10.16. FDA U.S. Food and Drug Administration. National Shellfish Sanitation Program. Guide for the control of Molluscan Shellfish. Carpenter II. Growing Areas. Section IV. (2007).

10.17. FSIS USDA MLG 8.08 Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry and egg products, and environmental samples.

10.18. Wallace H. Andrews, Andrew Jacobson, and Thomas Hammack Bacteriological Analytical Manual. Capítulo 5 *Salmonella* 8th revisión, (Noviembre 2011) <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>.

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

10.20. International Standar ISO/TS 11133-1:2009 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Guidelines on preparation and production of culture media -- Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory. (2009).

10.21. International Standar ISO/TS 11133-2:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Guidelines on preparation and production of culture media -- Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media.

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.

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

TRANSITORIOS

PRIMERO.- La entrada en vigor de la presente Norma deja sin efectos 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.

SEGUNDO.- 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 23 de abril de 2013.- 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 Normativo A.

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* 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; y
- Identificación bioquímica y confirmación serológica de los microorganismos.

Nota: *Salmonella* puede presentarse en pequeños números y en algunas ocasiones ir acompañada de una gran carga microbiana de otras enterobacterias u otras familias. Es por lo que se hace necesario el pre-enriquecimiento para permitir la detección de un número bajo y/o células estresadas de *Salmonella spp*.

A.2. EQUIPO.

A.2.1. Aparato de esterilización de calor húmedo y calor seco.

A.2.2. Incubadora capaz de operar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

A.2.3. Baño de agua capaz de operar a $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ o incubadora capaz de trabajar a $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

A.2.4. Baño de agua capaz de operar a $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

A.2.5. Baño de agua capaz de operar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

A.2.6. Potenciómetro.

A.2.7. Balanza granataria con sensibilidad de 0,1g verificada el día de uso.

A.2.8. Homogeneizador peristáltico o licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato, con vasos esterilizables (vidrio o aluminio).

A.3. MATERIALES.

A.3.1. Asa de platino o níquel de aprox. 3mm de diámetro o 10 μ l.

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 o micropipetas calibradas y verificadas.

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 140mm.

A.3.6. Cucharas, bisturíes, cuchillos y pinzas.

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

A.3.8. Gradillas para tubos de ensaye.

A.3.9. Mecheros Bunsen o Fisher.

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 descarboxisolato.

A.4.13. Solución salina fisiológica.

A.4.14. Medio Triptófano/Triptona.

A.5. REACTIVOS.

A.5.1. Reactivos para la reacción VP.

A.5.2. Reactivos para la reacción de indol.

A.5.3. Antisuero somático (O) polivalente de *Salmonella*.

A.5.4. Tolueno.

A.5.5. α -naftol.

A.5.6. Solución de creatina.

A.5.7. KOH.

A.5.8. *Salmonella* Typhimurium (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% 4-Dimetilaminobenzaldehído.

A.5.16. Ácido hidroclicóric, $\rho = 1.18\text{g/mL}$ a 1.19g/mL .

A.5.17. 2-metilbutan-2-ol.

A.5.18. Cloruro de sodio.

A.5.19. Monohidrato de creatinina.

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. Bibliografía 10.23

La preparación de la suspensión inicial requiere 25g de la muestra en una cantidad suficiente 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 37°C +/-1°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 A.7.

A.6.2.2. Productos que contienen cacao. Bibliografía 10.23

Agregar al agua peptonada amortiguada 50g/L de caseína (no usar caseína ácida) o 100g/L de leche descremada en polvo, si el alimento tiene alta probabilidad de estar contaminado con microorganismos Gram positivos, incubar a 37°C ± 1°C por 2h, añadir 0.018g/L de verde brillante. Continuar como se indica en A.7.

A.6.2.3. Productos ácidos y acidificantes. Bibliografía 10.23

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. Continuar como se indica en A.7.

A.6.2.4. Preparación de la muestra para moluscos en concha. Bibliografía 10.24

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 10 a 12 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 20 a 30 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 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 A.6.2.5

A.6.2.5. Procedimiento para moluscos, desconchados y congelados. Bibliografía 10.24

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 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, bisquets y pan) Fórmulas infantiles y alimentos para administración por cánula u oral, que contengan huevo. De preferencia, no descongelar las muestras antes de su análisis. Si están congeladas, atemperar las muestras para obtener la porción analítica. Descongelar tan rápido como sea posible para disminuir el incremento en el número de microorganismos competentes o para reducir el daño potencial sobre las células de Salmonella. Descongelar en un baño de agua con temperatura controlada a 45°C, durante 15 min y con agitación constante, o descongelar manteniendo la muestra a 2-5°C durante 18h. Pesar 25g de la muestra en condiciones asépticas, colocar en un frasco de boca ancha y tapa de rosca de 500mL. 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 10, 10, 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 ± 5 min a temperatura del laboratorio. Mezclar por agitación Aflojar la tapa a un 1/4 de vuelta, e incubar a 37°C 18 ± 2h. Continuar como se indica en A.7.

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 3 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 200-300mL 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 10 seg, 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 casarón caigan en el contenedor. Mezclar completamente las yemas y claras con una cuchara o cualquier otro instrumento estéril. Mantener las muestras a temperatura ambiente (20-24°C) por 96 ± 2 h. 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 ± 5 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 ± 2 h a 35°C. Continuar como se indica en A.7.

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 (20-25°C) por 96 ± 2 h. Después de este tiempo, adicionar 3375mL de CST suplementado con sulfato ferroso. Mezclar bien por agitación. Dejar en reposo durante 60 ± 5 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 ± 2 h a 35°C. Continuar como se indica en A.7.

A.6.2.7.3. Huevo cocido (de pollo, pato u otros, hervidos). Si el cascarón del huevo se encuentra intacto, desinfectar como se describe en el inciso 9.1.2 a) 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 en para huevo en cascaron.

A.6.2.8. Leche descremada en polvo y Caseína. Adicionar el agua peptonada amortiguada preferiblemente 50g/l de caseína (a excepción de caseína acida) o 100g/L de leche descremada en polvo y adicionar después de 2h de incubación, 0.018g/L de verde brillante si el alimento tiene alta probabilidad de estar contaminado con microbiota Gram Positivo. Incubar a 37°C ± 2 h. Continuar como se indica en A.7.

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 está congelada, para obtener la porción por analizar debe dejarse atemperar, descongelando cerca de 45°C durante <15 min, en un baño de agua con temperatura controlada y flujo continuo o preferentemente mantener durante 18h a 2-5°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 ± 2 h a 37°C. Continuar como se indica en A.7.

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 ± 5 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 ± 2 h a 35°C. Continuar como se indica en A.7.

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 ± 5 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 ± 2 h a 35°C. Continuar como se indica en A.7.

A.6.2.12. Especies.

A.6.2.12.1. Pimienta negra, pimienta blanca, semillas de apio en hojuelas, chile en polvo, cominos, pprika, 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 ± 5 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 ± 2 h a 35°C . Continuar como se indica en A.7.

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 (5 g 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, si es necesario, ajustar el volumen final a 225mL. Agregar 225mL de CST adicionado con K_2SO_3 , a los 25g de muestra y mezclar bien. Continuar como se indica en el punto anterior.

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/caldo; 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 en para la pimienta negra, manteniendo las relaciones muestra/caldo, recomendadas.

A.6.2.13. Dulce, cubierta de dulce (incluyendo chocolate). Pesar en condiciones asépticas, 25g de muestra en un vaso de licuadora. 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 ± 5 min, con la tapa bien cerrada, a temperatura del laboratorio. Mezclar bien por agitación y determinar pH con papel indicador. 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 ± 2 h a 35°C . Continuar como se indica en A.7.

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 ± 5 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 15 min) y mezclar bien. Alternativamente se puede usar Triton X-100 (pasado por vapor fluente durante 15 min). Limitar el uso de estos surfactantes a la cantidad mínima necesaria para iniciar la espuma. En el caso de Triton X-100, con 2 a 3 gotas es suficiente. Aflojar la tapa a un 1/4 de vuelta e incubar durante 24 ± 2 h a 35°C . Continuar como se indica A.7.

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 6.0, pesar en condiciones asépticas, 25 g de muestra en un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca de 500mL o cualquier otro recipiente adecuado. Agregar 225mL de caldo tetratationato (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 del laboratorio durante 60 ± 5 min, con la tapa bien cerrada. Ajustar el pH a 6.8 ± 0.2 con un potencmetro y agregar 2.25mL de solución al 0.1% de verde brillante mezclar completamente, por agitación. Aflojar la tapa a un 1/4 de vuelta e incubar durante 24 ± 2 h a 35°C . Continuar como se indica en A.7.3

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 37°C por 60 ± 5 min. Mezclar bien y aflojar la tapa a un 1/4 de vuelta e incubar durante 18 ± 2 h a 35°C . Continuar como se indica en A.7.

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 2 min. Aflojar la tapa a un 1/4 de vuelta e incubar durante 24 ± 2 h a 37°C . Continuar como se indica en A.7.

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 37°C por 18 ± 2h. Continuar el análisis, como se indica en A.7.

A.6.2.20. Conejo en canal. Introducir el conejo en una bolsa de plástico estéril y colocarlo en un vaso u otro contenedor adecuado. Adicionar agua peptonada amortiguada en una proporción 1:9 De muestra/caldo (g/mL) para cubrir la muestra. Mezclar bien con agitación Incubar a 37°C por 18 ± 2h. Continuar el análisis como se indica en A.7.

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 ± 2h a 35°C. Continuar como se indica en A.9. (alimento de carga microbiana baja).

A.6.2.22. Orejas de puerco. Colocar en un bolsa de plástico una pieza (de 2 a 3 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 37°C por 18 ± 2h. Continuar como se indica en 9.2.

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°C durante 15 min y con agitación constante, o descongelar manteniendo la muestra a 2-5°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 37°C por 18 ± 2h. Continuar como se indica en A.7.

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 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 37°C por 18 ± 2 h. Continuar como A.7.

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°C durante 15 min y con agitación constante, o descongelar manteniendo la muestra a 2-5°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 adecuado. Aflojar la tapa 1/4 de vuelta e incubar a 37°C por 18 ± 2h. Continuar como se indica en A.7.

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 5 L. Incubar abriendo ligeramente la bolsa a 37°C por 18 ± 2 h. Continuar como A.7.

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 adecuado. Aflojar la tapa a 1/4 de vuelta e incubar durante 18 ± 2h a 37°C. Continuar como se indica en A.7.

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 caldo universal 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 37°C por 18 ± 2h. Continuar como A.7.

A.6.2.29. Muestras ambientales. Muestrear superficies ambientales con hisopos o esponjas estériles. Colocarlos en una bolsa estéril que contenga suficiente caldo Dey-Engly 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 ± 2°C. Analizar las muestras dentro de las siguientes 48 ± 2h 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. Mezclar, por agitación, aflojar la tapa o la boca de la bolsa e incubar durante 18 ± 2h a 37°C. Continuar como se indica en A.7.

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 37°C durante 18 ± 2h. Continuar como se indica en A.7.2 (tratarla como un alimento con carga microbiana alta).

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 37°C por 18 ± 2h. Continuar como se describe en A.7.

Nota: Para porciones grandes de agua peptonada amortiguada precalentar a 37°C ± 1°C antes de la inoculación de la muestra a analizar.

A.7. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.

A.7.1. Pre-enriquecimiento.

En general incubar la dilución inicial a 37°C ± 1°C por 18h ± 2h.

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 37°C ± 1°C por 18h ± 2h.

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°C ± 1°C por 24h ± 3h y el caldo MKTTn a 37°C ± 1°C por 24h ± 3h.

A.7.3. Aislamiento e identificación.

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

Agar XLD y cualquier otro medio selectivo sólido complementario al agar XLD y especialmente apropiado para el aislamiento de *Salmonella* lactosa positiva, *Salmonella Typhi* y *Salmonella Paratyphi*; el laboratorio puede seleccionar que medio utilizar. Por ejemplo, se pueden elegir el ASB, EH, Agar Verde Brillante, entre otros.

El agar XLD se incuba a 37°C ± 1°C durante 24h ± 3h, el segundo y tercero 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*.

Seleccionar 2 o más colonias de *Salmonella* 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* pueden producir colonias con un centro negro muy grande o completamente negras.

A.7.3.1.2. EH. Colonias azul-verde o azules, con o sin centro negro. Muchos cultivos de *Salmonella* pueden producir colonias con un centro negro muy grande o completamente negras.

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.

Si se presentan colonias típicas en ASB después de 24 ± 2 h de incubación, seleccionar 2 o más colonias. Si por el contrario, no se observan colonias típicas a las 24 ± 2 h, re-incubar las placas de ASB, otras 24 ± 2 h. Después de 48 ± 2 h de incubación, seleccionar si están presentes, 2 o más colonias típicas. Si las colonias seleccionadas, no dan reacciones típicas en TSI y LIA, el cultivo se considera como negativo a *Salmonella*.

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

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

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

Nota: Algunas cepas variables de *Salmonella* como: H₂S negativo (ej. *S. Paratyphi A*) crece en XLD como colonias rosas con el centro de un color rosa oscuro. *Salmonella Lactosa* – positiva crece en XLD como 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 medio selectivo al menos dos colonias consideradas como típicas o 4 colonias sospechosas si no existe la primera posibilidad.

En casos epidemiológicos identificar al menos 5 colonias típicas y 5 atípicas, 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 agar nutritivo, preferiblemente sin agua de condensación, de tal manera que permita el aislamiento de colonias. Incubar las placas inoculadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h} \pm 3\text{h}$.

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 estria 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. Mantener las placas de agares selectivos a $5-8^{\circ}\text{C}$.

Incubar los tubos de TSI y LIA a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 3 h. 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*, 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* lactosa positiva es aislada, el agar de TSI se torna completamente amarillo.

En LIA, *Salmonella* 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* producen H₂S en LIA. Algunos cultivos que no son de *Salmonella*, producen un color rojo ladrillo en la parte inclinada del 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*, para someterlos a pruebas bioquímicas adicionales y pruebas serológicas.

Para los cultivos de TSI que se consideran presuntivos para *Salmonella*, continuar como se indica en Identificación de *Salmonella* 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. Una prueba positiva está dada por el uso de la urea generando amoníaco produciendo un cambio en la coloración del medio a color rojo rosado, una prueba negativa no se produce cambio en la coloración (amarillo anaranjado). Incubar 24 ± 2h a 37°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 durante a 37°C ± 1°C por 24 ± 3h. Las especies de *Salmonella* dan reacción alcalina (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 1 gota de tolueno y agitar. Colocar el tubo en un baño de agua a 37°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 37°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 medio triptófano/triptona con una suspensión homogénea de la colonia sospechosa.

Incubar a 37°C ± 1°C por 24 ± 3h después de la incubación adicionar 1mL de reactivo de Kovacs.

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 37°C ± 1°C por 24± 3h.

Después de la incubación adicionar 2 gotas de solución de creatinina, 3 gotas de solución 1-naftol y al final 2 gotas de solución de KOH, agitar después de cada reactivo.

La formación de un color rosa a rojo brillante en menos de 15 min indica una reacción positiva.

f) Identificación presuntiva del género *Salmonella*.

Alternativamente se pueden utilizar pruebas bioquímicas miniaturizadas o métodos de biología molecular disponibles en el mercado para la identificación presuntiva de género *Salmonella*, 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.**

Prueba	Cepas de <i>Salmonella</i>									
	S.Typhi		S. Paratyphi A		S. Paratyphi B		S. Paratyphi C		Otras cepas	
	Reacción	% ^b	Reacción	% ^b	Reacción	% ^b	Reacción	% ^b	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 sacarosa	-	0	-	0	-		-		-	1
TSI producción de sulfuro de hidrógeno	+	97	-	10	+		+		+	92
Hidrólisis de urea	-	0	-	0	-		-		-	1
Descarboxilación de la lisina	-	98	-	0	+		+		+	95
Reacción de 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 *Salmonella*. National center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA, 1996

^b este porcentaje indica que no todas las cepas de *Salmonella* muestran la reacción indicada puede ser más o menos. Estos porcentajes pueden variar dependiendo de los serotipos involucrados en brote de intoxicación alimentaria y su lugar de procedencia.

^c los porcentajes no han sido encontrados en la literatura

^d *Salmonella* Typhi es anaerobio

^e La *Salmonella enterica* subespecie *Arizonae* puede ser positiva o negativa a la lactosa pero siempre será 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* para las cepas probadas por TSI y LIA, existen cepas que no aglutinan con el polivalente, para éstos 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 una lámina de vidrio perfectamente limpia. 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 30 a 60seg. Observe el resultado sobre un fondo oscuro, preferiblemente con la ayuda de una lupa. Si las bacterias se agrupan en unidades más o menos distintas, la cepa se considera como autoaglutinable y no debe someterse a las siguientes pruebas, porque la detección de los antígenos no es factible.

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 del antisuero 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 de la COFEPRIS (CCAYAC) para su identificación serológica o molecular.

A.8. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

a) Los cultivos determinados como presuntivos con las pruebas bioquímicas o 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*, informar:

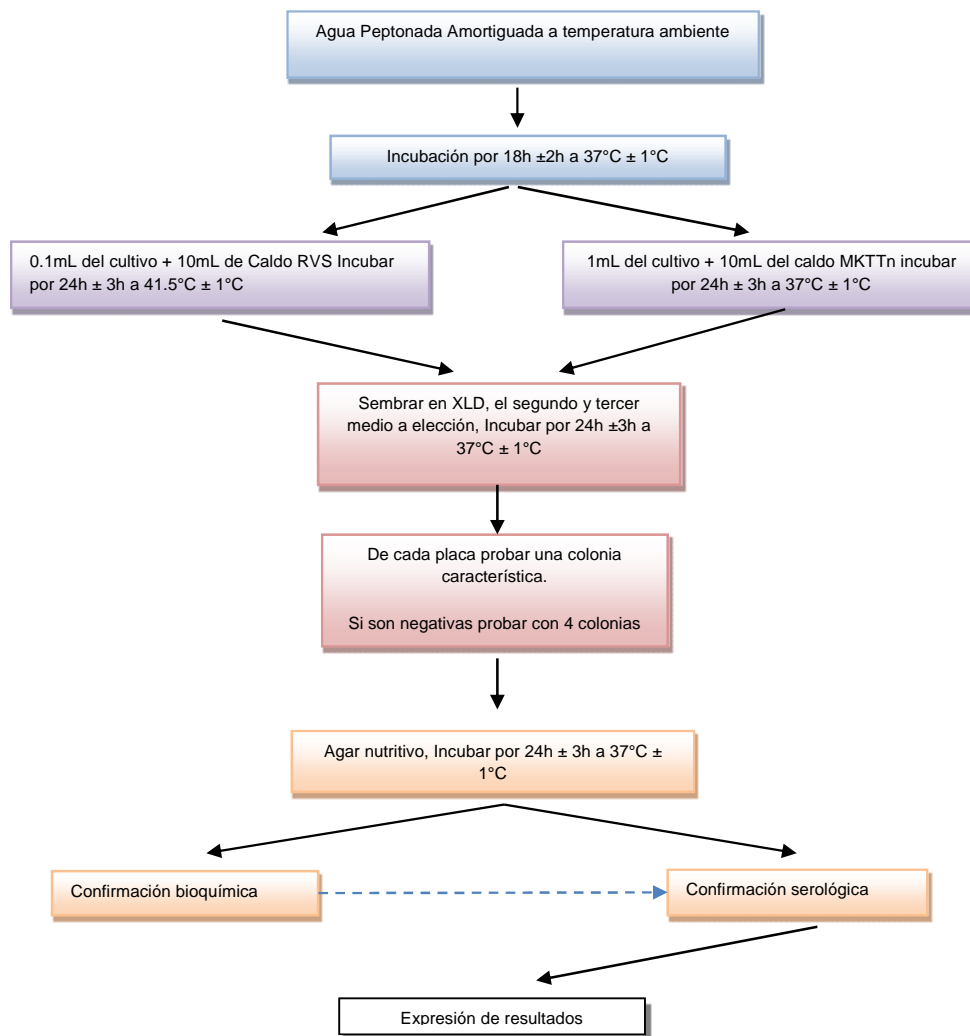
Salmonella spp en 25g: AUSENCIA.

c) Placas con agar XLD, ASB y EH 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* en la porción de ensayo (g o mL) de producto utilizado.

A.9. AYUDA VISUAL.



Pre-enriquecimiento.



Enriquecimiento Selectivo.



Aislamiento.**Confirmación.****A.10. FORMULACIONES Y PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.**

Alternativamente pueden utilizarse medios comerciales a menos que se indique otra cosa.

La caducidad de los medios de cultivo una vez preparado deberá ser demostrada en el laboratorio bajo las condiciones de almacenamiento particulares, a menos que se indique otra cosa.

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	100.0mL

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	3.75g
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	2.5g
Agar	15.0g

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 15min 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 $44^{\circ}\text{C} - 47^{\circ}\text{C}$ y esperar a que el medio se atempere, agitar y vaciar 15mL del medio fundido a placas estériles, dejar solidificar. La superficies de las placas debe estar completamente seca 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	20.0g
NaCl	5.0g
Lactosa	10.0g
Sacarosa	10.0g
Glucosa	1.0g
Citrato de fierro (III)	0.3g
Tiosulfato de sodio	0.3g
Rojo de fenol	0.3g
Agar	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 bisel de 2.5cm – 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

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	≈ 3mL
Agua, para un volumen final de	50mL

A.10.8.1.2. Preparación: Disolver el fosfato dihidrogenado de sodio en ≈ 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 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 15min a 121°C.

A.10.9.2. Solución de creatinina (N-amidinosarcosina).

A.10.9.2.1. Fórmula.

Monohidrato de creatinina	0.5g
Agua	100mL

A.10.9.2.2. Preparación: Disolver el monohidrato de creatinina en el agua.

A.10.9.3. 1-naftol, solución etanólica

A.10.9.3.1. Fórmula

1-Naftol	6g
Etanol al 96%	100mL

A.10.9.3.2. Preparación: Disolver el 1-naftol en el agua.

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. Medio Triptona/triptófano.

A.10.10.1.1.Fórmula.

Triptona	10g
NaCl	5g
DL-Triptófano	1g
Agua	1000mL

A.10.10.1.2. Preparación: Disolver los ingredientes en el agua hirviendo. En caso necesario, ajustar el pH a 7.5 ± 0.2 a 25°C. Distribuir volúmenes de 5mL del medio a tubos de ensaye. Esterilizar 15 min a 121°C.

A.10.11. Reactivo de Kovacs.

A.10.11.1. Fórmula.

4-Dimetilaminobenzaldehido	5g
Ácido hidroclicrico, $\rho = 1.18 \text{ g/mL}$ a 1.19 g/mL	25mL
2-metilbutan-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 tal 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
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	0.065g
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 sobrecalentar. Enfriar a $45\text{-}50^\circ\text{C}$. Distribuir en porciones de 20mL en cajas Petri de 15 x 100mm. Dejar secar por 2h con las tapas parcialmente abiertas. Almacenar hasta 30 días en refrigeración ($4 \pm 2^\circ\text{C}$).

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

Polipeptona (o peptona)	10g
Extracto de carne	5g
Dextrosa	5g
Na_2HPO_4 (anhidro)	4g
FeSO_4 (anhidro)	0.3g
Sulfito de bismuto (indicador)	8g
Verde brillante	0.025g
Agar	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 1min hasta obtener una suspensión uniforme (el precipitado no se disuelve). Enfriar a 45-50°C. Suspender el precipitado con agitación suave y distribuir volúmenes de 20mL en cajas Petri estériles de 15 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.

Apéndice Normativo B.

Método de referencia para la estimación de la cuenta de *Staphylococcus 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.

B.2. *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. *S. aureus* produce enterotoxinas 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 basado 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, pero se pueden distinguir por medio del uso de pruebas adicionales, como son la termonucleasa y 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 como determinante y pruebas auxiliares cuando la determinación de la coagulasa es débil.

B.3. EQUIPO.

B.3.1 Horno para esterilizar que alcance 180°C.

B.3.2 Autoclave.

B.3.3 Balanza con capacidad no mayor de 2,500g y sensibilidad de 0.1g.

B.3.4 Incubadora a capaz de operar a 35°C \pm 1°C.

B.3.5 Homogeneizador peristáltico tipo Stomacher.

B.3.6 Baño de agua capaz de operar a 35°C \pm 1°C.

B.4. MATERIALES.

B.4.1 Cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas.

B.4.2 Tubos de cultivo de 16mm x 150mm o frascos de 125 a 250mL de capacidad.

B.4.3 Tubos de cultivo de 10mm x 75mm.

B.4.4 Cajas Petri de 90 a 100mm de diámetro.

B.4.5 Pipetas bacteriológicas de 1mL y 10mL de capacidad graduadas en 0.1mL y 1mL respectivamente y diámetro de 2 a 3mm.

B.4.6 Pipetas Pasteur.

B.4.7 Probetas.

B.4.8 Varillas de vidrio de 3.5mm de diámetro aproximadamente y 20cm de largo dobladas en ángulo recto u equivalente.

B.4.9 Matraz Erlenmeyer.

B.4.10 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.5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.

B.5.1 Agar Baird Parker.

B.5.2 Solución de telurito de potasio.

B.5.3 Emulsión de yema de huevo (puede usarse comercialmente preparada).

B.5.4 BHI.

B.5.5 Solución reguladora de fosfatos.

B.5.6 Agua peptonada.

B.5.7 Solución Salina 0.85%.

B.5.8 Agar Azul de Toluidina-ADN.

B.5.9 Plasma de Conejo con EDTA.

B.5.10 Agar Soja Tripticaseina.

B.5.11 Peróxido de hidrógeno al 3%.

B.5.12 AST.

B.5.13 Reactivos para la tinción de Gram.

B.5.14 Caldo rojo de fenol (glucosa y manitol).

B.5.15 Solución de Piruvato de Sodio.

B.5.16 Aceite de parafina o mineral estéril.

B.5.17 *S. aureus*.

B.5.18 *S. epidermidis*.

B.5.19 Solución trazable para calibración de potenciómetro (CENAM).

B.6. CONDICIONES DE PRUEBA.

B.6.1 Preparación de la muestra.

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

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

B.6.2 Preparación de la muestra para Moluscos en concha

Como se indica en A.6.2.4.

B.6.3 Procedimiento para Moluscos, desconchados y congelados.

Como se indica en A.6.2.5

B.6.4 Productos de la pesca.

Pesar 200g del alimento en 200mL de regulador de fosfatos (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.7. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.

B.7.1 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: 0.4, 0.3 y 0.3mL sobre la superficie de las placas de agar Baird-Parker, por duplicado. En ambos casos evitar usar cajas húmedas.

B.7.2 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.7.3 Mantener las placas con las tapas hacia arriba hasta que el inóculo sea absorbido totalmente por el agar.

B.7.4 Invertir las placas e incubar por 24 a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, marcar las colonias típicas observadas. Morfología colonial típica colonias negras, circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1 a 2mm y muestran una zona opaca, húmedas y con un halo claro (de proteólisis) alrededor de la colonia. Reincubar las placas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por otras 22 a 24h y marcar las nuevas colonias típicas.

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.7.5 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 de cada placa 5 colonias típicas y 5 colonias atípicas, para su confirmación.

B.7.6 Cuando las placas tengan menos de 15 colonias típicas se debe agregar la nota de "valor estimado" al reporte de los resultados.

B.7.7 Si fue inoculado 1.0mL en 3 placas, tratar éstas como una sola y seguir los procedimientos de confirmación.

B.7.8 Confirmación: Prueba de Coagulasa.

B.7.8.1 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 20 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 $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en baño de agua y observar periódicamente a intervalos de 1h durante las primeras 4 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.

B.7.8.2 Nota: Para cada reactivo nuevo se deberá realizar la prueba de coagulabilidad del plasma de conejo añadiendo una gota de calcio al 5% a 0.5mL de plasma reconstituido, formándose un coágulo en 10-15 seg.

B.7.9 Pruebas auxiliares.

B.7.9.1 Realizar una **tinción de Gram** a cada cultivo observar al microscopio y observar la presencia de cocos Gram positivos.

B.7.9.2 Si se dispone de un sistema de bioquímicas miniaturizado, éste puede ser utilizado como alternativa de las siguientes pruebas, con excepción de la termonucleasa y la tinción de Gram.

B.7.9.3 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 1 gota de peróxido de hidrógeno al 3%. Observar la producción de burbujas de gas.

B.7.9.4 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 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. 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.7.9.5 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 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. 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.

B.7.9.6 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, 0.3 mL 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 $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en cámara húmeda de 4 a 24h. La aparición de un halo color rosa extendido de por lo menos 1mm alrededor de la perforación se califica como positiva la prueba.

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	+	-	-

^a +, La mayoría de las cepas son positivas (más del 90%), La mayoría de las cepas son negativas (más del 90 %)

B.8. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

B.8.1. Si al menos el 80% de las colonias típicas seleccionadas fueron coagulasa positiva, tomar el número total de las colonias contadas como presuntivas de *S.aureus*.

B.8.2. En otros casos, calcular el número de colonias presuntivas de *S. aureus* a partir del porcentaje obtenido de colonias coagulasa positivas confirmadas.

B.8.3. Promediar los resultados de los duplicados.

B.8.4. 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.8.5. Cuando no se tenga crecimiento reportar como:

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

B.8.6. 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 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 positiva por lo que el 60%, es decir, 51 colonias son consideradas como *S. aureus*.

La cuenta promedio es:

$$65+51 / 2 = 58 \text{ } S. \text{ aureus.}$$

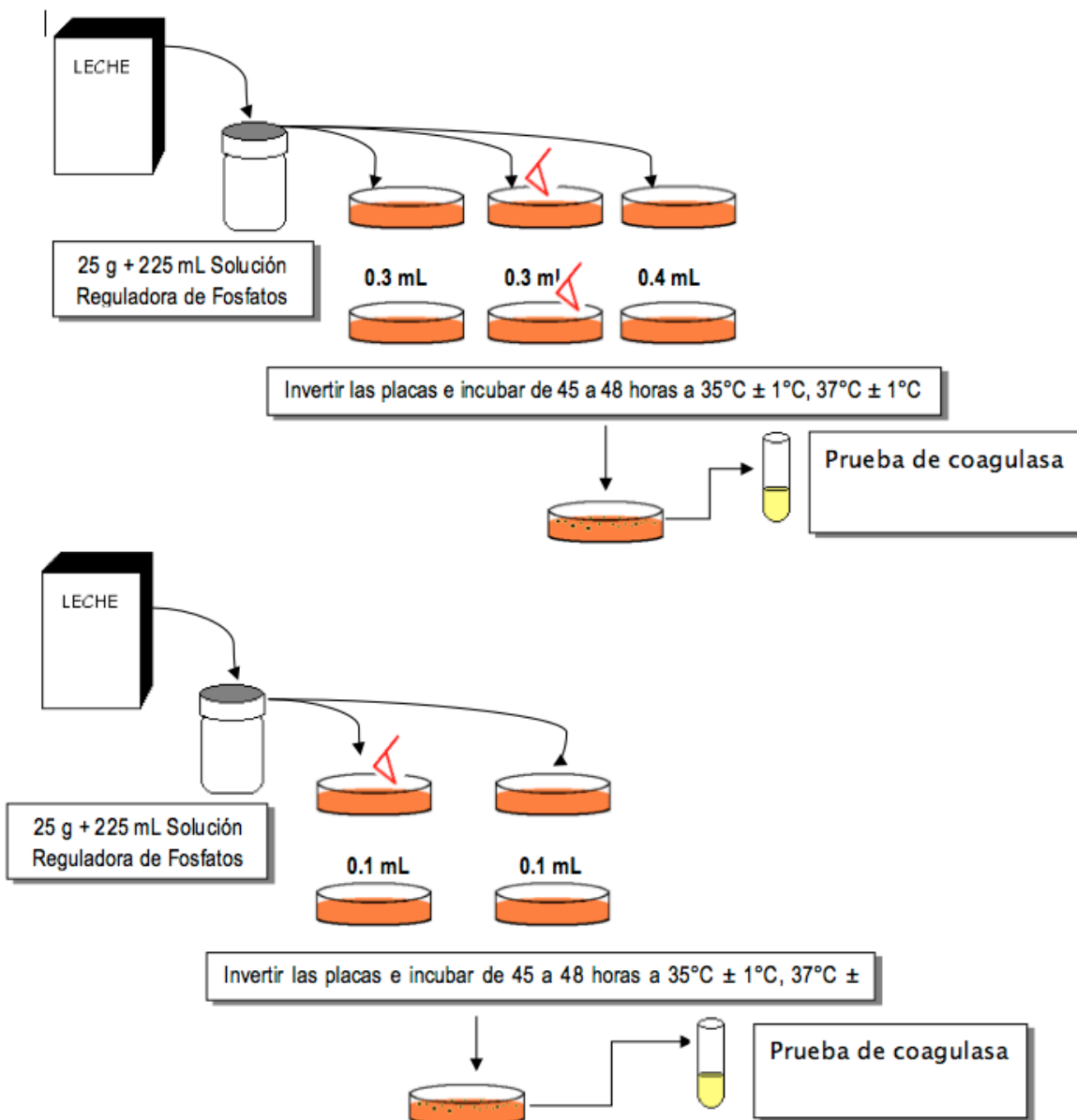
58 por el inverso del factor de dilución ($1/10^{-2}$) es 5800 UFC.

Si se considera que el inóculo fue de 0.1mL habrá que multiplicar por 10 para obtener 58000UFC/mL.

B.8.7. 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.9. Ayuda Visual.



B.10. Composición y preparación de medios de cultivo y reactivos.

B.10.1 Agar Baird Parker.

B.10.1.1. Medio base.

B.10.1.2. Fórmula.

Triptona	1g
Extracto de carne	5g
Extracto de levadura	1g
Piruvato de sodio	1g
Glicina	1g

Cloruro de litio .6H ₂ O	5g
Agar	20g
Agua destilada	1L
pH final 7.0 ± 0.2.	

B.10.1.3. 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 48-50°C antes de adicionar los ingredientes de enriquecimiento o almacenar el medio solidificado a 4 ± 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 15-18mL en cajas Petri 15 x 100mm. El medio debe ser densamente opaco. Secar las placas antes de su uso. Guardar las placas preparadas 20-25°C hasta 5 días.

B.10.2 Emulsión de yema de huevo.

B.10.2.1 Preparación. *(Sólo si una presentación comercial no está disponible)*

Utilizar huevos frescos, separar la yema de la clara.

Mezclar las yemas con 4 veces el volumen de agua, calentar la mezcla en un baño de agua, controlando la temperatura a 45 ± 0.5°C por 2h y dejar reposar por de 18 a 24h de 0 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 a 8°C por no más de 72h.

B.10.3 Solución de Telurito de potasio.

B.10.3.1 Fórmula.

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

B.10.3.2 Preparación: Disolver el telurito de potasio en agua con un mínimo calentamiento.

Esterilizar por filtración.

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

B.10.4 BHI.

B.10.4.1 Fórmula.

Peptona	1.0g
Infusión cerebro de ternero deshidratado	100mL
Infusión corazón de res deshidratado	5.0g
Glucosa	2.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Fosfato disódico Na ₂ HPO ₄	2.5g
Agua	1000mL

B.10.4.2 Preparación: Disolver los componentes o el medio completo comercial en agua hirviendo, ajustar el pH para que después de la esterilización se encuentre entre en 7.4 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 a 5°C.

B.10.5 Plasma de Conejo.

B.10.5.1. 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, cepas ligeramente positivas de *S. aureus* y con cepas negativas.

B.10.6 Agar Azul de Toluidina.

B.10.6.1 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.10.6.2. 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.10.7 Solución Reguladora de Fosfatos.

B.10.7.1. Fórmula.

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

B.10.7.2. 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 un L con agua destilada. Esterilizar durante 15 min a 121°C ± 1°C.

Para diluciones.

Añadir 1.25mL de solución concentrada de reguladora de fosfatos a un L de agua destilada y ajustar el pH a 7.2 distribuir en frascos de dilución en volúmenes de 97mL. Esterilizar a 121°C ± 1°C durante 15 min.

B.10.8 AST.

B.10.8.1. Fórmula.

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

B.10.8.2. Preparación: Suspender los ingredientes en un L 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.10.9 Caldo Rojo de Fenol (para fermentación de carbohidratos).

B.10.9.1. Fórmula.

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

B.10.9.2. 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 13 X 100mm con campana de Durham. Esterilizar a 121°C por 15min 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.10.10 Aceite de parafina estéril.

Puede esterilizar por filtración en membrana de 0.22 µm

Se recomienda el uso de Unidad de filtración estéril Millex 33mm con membrana MF-Millipore Catálogo SLGS033SS (0.22 µm) o equivalente.

Apéndice Normativo C.

Método de referencia para el aislamiento de *L. monocytogenes*.

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.

El método para detectar la presencia de *L. monocytogenes* se basa en el aislamiento y la diferenciación de especies de *Listeria spp*, principalmente por la fermentación de carbohidratos y la actividad hemolítica de los miembros de este género.

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° 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.

Este método permite hacer una estimación del contenido 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.

C.2. EQUIPO.

C.2.1. Equipos de esterilización de calor húmedo y calor seco.

C.2.2. Balanza con capacidad no mayor de 2,500g y sensibilidad de 0.1g.

C.2.3. Incubadoras a las diferentes temperaturas: 25°C ± 1°C, 30°C ± 1°C y 35°C ± 1°C o 37°C ± 1°C. Baño de agua con una temperatura controlada de 47°C ± 2°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.3. MATERIALES.

C.3.1. Asa de platino o níquel de Aprox. 3mm de diámetro o 10µl.

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

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

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

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

C.3.6. Cucharas, bisturíes, 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.

C.3.10. Mecheros Bunsen o Fisher.

C.3.11. Todo el material que tenga contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse mediante: Horno, durante 2h a 170-175°C o autoclave, durante 15 min como mínimo a 121°C ± 1°C.

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 completa concentración de agentes selectivos.

C.4.3. Agar Oxford.

C.4.4. Agar PALCAM.

C.4.5. TSYA.

C.4.6. CTSYE.

C.4.7. Agar sangre de cordero.

C.4.8. Caldo carbohidrato (ramnosa y xilosa).

C.4.9. Agar movilidad.

C.4.10. Solución de Peróxido de hidrógeno.

C.4.11. PBS.

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.

C.5.5. *L. ivanovii*.

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.

En general, 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 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 por un total de $48\text{h} \pm 2\text{h}$ a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

C.7.3. Siembra en medios Selectivos e Identificación.

Después de la incubación, examine el Caldo Fraser para detectar la presencia de *L. monocytogenes* mediante la observación visual de la hidrólisis de la esculina que al ser positiva obscurece el caldo. Si se tiene cualquier grado de obscurecimiento.

Del primer enriquecimiento selectivo, 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 segundo enriquecimiento incubado a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $48 \pm 2\text{h}$, inocular 2 placas con agar Oxford y 2 placas con PALCAM por estría cruzada.

Invertir las placas e incubar el agar Oxford y PALCAM a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

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 con 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 las placas 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 1.5 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 1.5 a 2mm de diámetro, con el centro hundido y rodeadas de un halo negro.

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

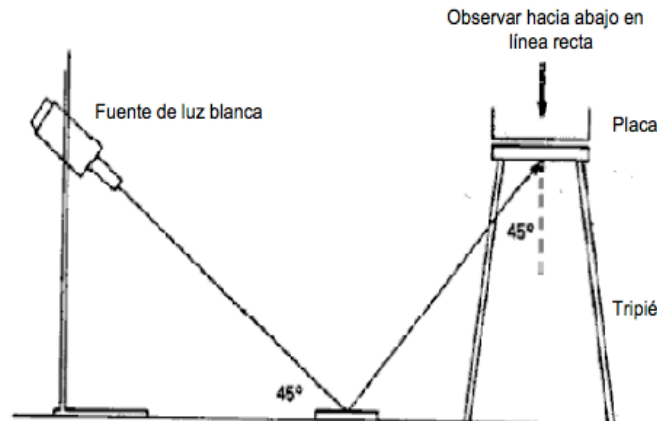
C.7.7.1. Selección de Colonias para su confirmación: Tomar de cada placa de agares selectivos, 5 colonias sospechosas de *Listeria spp.* Si se tiene que alguna de las placas tiene menos de 5 colonias presuntivas, tomar para su confirmación todas las colonias que hayan crecido.

C.7.7.2. Aislamiento: Inocular por estría cruzada, para obtener colonias aisladas en cajas con TSYEA. Incubar estas placas en una incubadora a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 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 para TSYEA con colonias típicas, con el sistema óptico Henry se trata de hacer incidir luz transmitida oblicuamente con una lámpara de luz blanca lo suficientemente potente como para iluminar la placa y en un ángulo de 45° . Las colonias aparecen de color azul-gris a azul. El uso de las colonias de control positivo y negativo es recomendado. La placa puede ser observando a simple vista pero el uso de un microscopio de disección o lupa es preferible.

Nota: La luz de Henry puede ser mejor percibida si el TSYEA 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 del metal con el reactivo.

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

C.7.7.6. Prueba de Movilidad: Tomar una colonia aislada de TSYA, 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 el agar de movilidad picando una colonia obtenida en TSYEA. 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.* da 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*

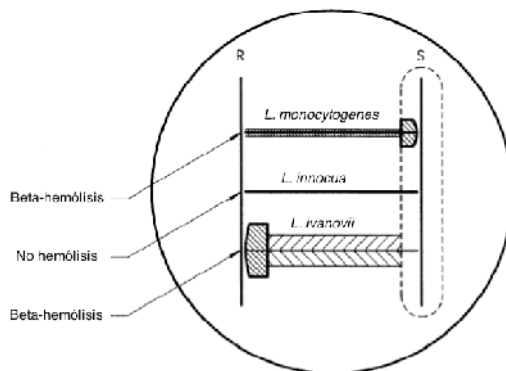
C.7.8.1. Prueba de hemólisis: Si las características morfológicas y fisiológicas, así como la catalasa son indicativos de *Listeria spp.*, inocular una placa con agar sangre de carnero al 5% para determinar la actividad hemolítica. Las placas de agar sangre no deben presentar agua de condensación en 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 una colonia aislada obtenida en TSYA 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 $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 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 TSYA. Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 5 días. Una reacción positiva se caracteriza por la producción de ácido y cambio de color a amarillo que ocurre dentro de las primeras 24 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 sembrar una estría de la cepa de *S. aureus* y otra línea paralela de *R. equi*, separadas lo suficiente para que entre éstas 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 $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 12 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 *Listeria 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 de la COFEPRIS (CCAyAC) para realizar 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
 (+): reacción débil
 +> 90% de reacción positiva
 -: sin reacción

Nota: Existen cepas extrañas de *L. monocytogenes* 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.8.3. 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.8.4. Expresión de Resultados.

C.8.5. De acuerdo con la interpretación de los resultados, informar la presencia o ausencia de *L. monocytogenes* en la muestra de ensayo, 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.

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. Dispensar 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	100mL

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

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.

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 cuatro soluciones por cada porción de 100mL de base inmediatamente antes de usar.

C.9.2. Caldo Fraser.

C.9.2.1. Medio Base.

C.9.2.1.1. 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 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 . Dispensar 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
Extracto de Levadura	3.0g
Agar	De 9 a $18\text{g}^{(1)}$
D-glucosa	0.5g

D-manitol	10.0g
Esculina	0.8g
Citrato de amonio, hierro III	0.5g
Rojo de Fenol	0.08g
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.

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 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.9.4.1.2. 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	2 mL

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 TSYE.

C.9.5.1. Fórmula.

Caldo triptona soya ⁽¹⁾	30g
Extracto de levadura	6.0g
Agar	de 9 a 18g ⁽²⁾
Agua	1000mL
Triptona	17.0g
Peptona de Soya	3.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Fosfato de potasio	2.5g
Glucosa	2.5g

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. vierta el medio en tubos de capacidad apropiada, para las pruebas. Esterilice por 15 min en autoclave a 121°C. Colocar los tubos en una posición inclinada. Dispensar en cajas Petri aproximadamente 15mL y dejar solidificar.

C.9.6. CTSYE.

C.9.6.1. Fórmula.

Caldo triptona soya ⁽¹⁾	30g
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 si es 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 9 a $18\text{g}^{(1)}$
Agua	1000mL
Sangre de Cordero Desfibrada	100mL
⁽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 agregue x mL de solución del carbohidrato a 9x mL 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 10 volúmenes de solución al 3% masa / masa

C.9.11. PBS.

C.9.11.1. Fórmula.

Fosfato de Sodio monobásico Dihidratado	8.98g
Fosfato de sodio Dibásico	2.71g
Cloruro de Sodio	8.5g
Agua	1000mL

C.9.11.2. Preparación: Disuelva los componentes en agua. Ajustar el pH si es necesario a modo que después de la esterilización sea de 7.2 ± 0.2 a 25°C . Esterilizar por 15 min en autoclave a 121°C .

Apéndice Normativo D.

Método alternativo para el recuento de Enterococos en agua.

D.1. INTRODUCCIÓN.

Este grupo fue separado del resto de los estreptococos fecales debido a que son relativamente específicos para la 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 cloruro de sodio y pH alcalino. La mayoría de las especies no se multiplican en agua. La ventaja de este grupo es su tendencia a sobrevivir en medios acuáticos más que *E. coli*, son más resistentes a la desecación y a la clorinación.

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 tres 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 número más probable y 3. Técnica del sustrato cromogénico definido.

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 período 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 16 x 150mm con tapón de rosca.

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

D.2.7. Propipeta.

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.4. MEDIOS DE CULTIVO.

D.4.1. Caldo Azida Dextrosa.

D.4.2. ASPE

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 control¹². 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 25 veces. Las muestras en frascos que tengan de a $\frac{3}{4}$ de lleno, deberán agitarse 25 movimientos de arriba abajo en un arco de 30cm completados en un tiempo de 7seg, 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). 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°C \pm 0.5°C por 24h a 48h. 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 los tubos con turbiedad, transferir una asada a placas de ASPE. Incubar las placas invertidas a 35°C \pm 0,5°C por 24h. El desarrollo de colonias de color café oscuro a negro con halos cafés, confirman la presencia de estreptococos fecales. Transferir las colonias características a tubos con caldo BHI con 6,5% de NaCl. Incubar a 45°C \pm 0.5°C. El crecimiento en este medio confirma la presencia de enterococos.

D.5.9. Cálculos.

D.5.9.1. Calcular la densidad de Enterococos por el número más probable 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%, utilizando 5 tubos con 20mL de muestra.			
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%, utilizando 10 tubos con 10mL de muestra.

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	,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, cuando proceda.

D.5.9.3. Para el caso de agua para uso recreativo utilizar 5 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°C ± 0.5°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 de Enterococos por el número más probable 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 3 diluciones con series geométricas.

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
0	0	0	<1,8	1	0	0	2	2	0	0	4,5	3	0	0	7,8	4	0	0	13
0	0	1	1,8	1	0	1	4	2	0	1	6,8	3	0	1	11	4	0	1	17
0	0	2	3,6	1	0	2	6	2	0	2	9,1	3	0	2	13	4	0	2	21
0	0	3	5,4	1	0	3	8	2	0	3	12	3	0	3	16	4	0	3	25
0	0	4	7,2	1	0	4	10	2	0	4	14	3	0	4	20	4	0	4	30
0	0	5	9,0	1	0	5	12	2	0	5	16	3	0	5	23	4	0	5	36
0	1	0	1,8	1	1	0	4	2	1	0	6,8	3	1	0	11	4	1	0	17
0	1	1	3,6	1	1	1	6,1	2	1	1	9,2	3	1	1	14	4	1	1	21
0	1	2	5,5	1	1	2	8,1	2	1	2	12	3	1	2	17	4	1	2	26
0	1	3	7,3	1	1	3	10	2	1	3	14	3	1	3	20	4	1	3	31
0	1	4	9,1	1	1	4	12	2	1	4	17	3	1	4	23	4	1	4	35
0	1	5	11	1	1	5	14	2	1	5	19	3	1	5	27	4	1	5	42
0	2	0	3,7	1	2	0	6,1	2	2	0	9,3	3	2	0	14	4	2	0	22
0	2	1	5,5	1	2	1	8,2	2	2	1	12	3	2	1	17	4	2	1	26
0	2	2	7,4	1	2	2	10	2	2	2	14	3	2	2	20	4	2	2	32
0	2	3	9,2	1	2	3	12	2	2	3	17	3	2	3	24	4	2	3	38
0	2	4	11	1	2	4	15	2	2	4	19	3	2	4	27	4	2	4	44
0	2	5	13	1	2	5	17	2	2	5	22	3	2	5	31	4	2	5	50
0	3	0	5,6	1	3	0	8,3	2	3	0	12	3	3	0	17	4	3	0	27
0	3	1	7,4	1	3	1	10	2	3	1	14	3	3	1	21	4	3	1	33
0	3	2	9,3	1	3	2	13	2	3	2	17	3	3	2	24	4	3	2	39
0	3	3	11	1	3	3	15	2	3	3	20	3	3	3	28	4	3	3	45
0	3	4	13	1	3	4	17	2	3	4	22	3	3	4	31	4	3	4	52
0	3	5	15	1	3	5	19	2	3	5	25	3	3	5	35	4	3	5	59
0	4	0	7,5	1	4	0	11	2	4	0	15	3	4	0	21	4	4	0	34
0	4	1	9,4	1	4	1	13	2	4	1	17	3	4	1	24	4	4	1	40
0	4	2	11	1	4	2	15	2	4	2	20	3	4	2	28	4	4	2	47
0	4	3	13	1	4	3	17	2	4	3	23	3	4	3	32	4	4	3	54

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 caldo BHI con 6.5% de NaCl incubado a $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ confirma la presencia de enterococos.

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.

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 de muestra con 10mL de caldo.	100mL de muestra con 20mL de caldo.
Extracto de Carne	4,5g	9,0g	13,5g	27,0g
Tripton 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 un L de agua. Esterilizar a 121°C durante 15min. El pH después de la esterilización debe ser de $7,2 \pm 0,2$ a 25°C .

D.8.9. ASPE.

D.8.2.1. Fórmula.

Ingredientes	Cantidad
Peptona C	17,0g
Peptona B	3,0g
Extracto de Levadura	5,0g
Bilis bacteriológica	10,0g

Cloruro de Sodio	5,0g
Citrato de Sodi	1,0g
Esculina	1,0g
Citrato Férrico amónico	0,5g
Azida de Sodio, NaN ₃	0,25g
Aga	15,0g
Agua	1,0L

D.8.2.2. Preparación: Disolver los ingredientes en un L de agua. Esterilizar a 121°C durante 15min. El pH después de la esterilización debe ser de $7,1 \pm 0,2$ 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.

D.8.10. BHI con 6.5% de NaCl.

D.8.3.1. Fórmula.

Ingredientes	Cantidad
Infusión de cerebro de ternera	200,0g
Infusión de corazón de res	250,0g
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 un L de agua. Distribuir en tubos de ensaye. Esterilizar a 121°C durante 15 min. El pH después de la esterilización debe ser de $7,4 \pm 0,2$.

Apéndice Normativo E.

Método de referencia “Sustrato 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 24h. Esta prueba detecta a los enterococos en 1UFC/100mL. La fluorescencia se produce cuando los enterococos metabolizan el indicador nutritivo. El medio puede utilizarse como presencia/ausencia o por cuantificación de: 5 tubos, 10 tubos, series de 15 tubos o el sistema de charolas de cuantificación (comercialmente disponibles).

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 20 x 150mm.
- E.2.5.** Tubos de ensaye de 16 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 366 nm.
- E.3.3.** Incubadora a $41^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ de aire o baño de agua.
- 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: 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 30°C). Separar cuidadosamente un paquete (que contiene el reactivo) de la tira. Golpear el paquete para asegurarse 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 24h 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 366-nm 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.4.2.2. Si la muestra se incuba por más de 28h, aplicar lo siguiente: Si no hay fluorescencia después de 28h, se considera una prueba negativa válida. Si hay fluorescencia después de 28h, se considera como un resultado inválido.

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 30°C). Separar cuidadosamente un paquete (que contiene el reactivo) de la tira. Golpear el paquete para asegurarse 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 24h 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 366-nm 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. Contar el número de celdas positivas (fluorescencia). Interpolar 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 unidades formadoras de colonias 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
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	14.0	15.1	16.1	17.1	18.1	19.1	20.2	21.2	22.2	23.2
1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	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
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	15.3	16.4	17.4	18.5	19.5	20.6	21.6	22.6	23.7	24.8	25.8
3	3.1	4.1	5.1	6.1	7.2	8.2	9.2	10.3	11.3	12.4	13.4	14.4	15.5	16.5	17.6	18.6	19.7	20.8	21.8	22.9	23.9	25.0	26.1	27.1
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	25.2	26.3	27.4	28.5
5	5.2	6.3	7.3	8.4	9.5	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
6	6.3	7.4	8.4	9.5	10.6	11.6	12.7	13.8	14.9	15.9	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
7	7.4	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
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	24.0	25.2	26.3	27.4	28.6	29.7	30.8	32.0	33.1	34.3
9	9.8	10.9	12.0	13.1	14.2	15.3	16.4	17.5	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
10	11.0	12.1	13.2	14.3	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
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
12	13.5	14.6	15.8	16.9	18.1	19.3	20.4	21.6	22.7	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	39.4	40.7
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	41.1	42.4
14	16.1	17.3	18.5	19.7	20.9	22.1	23.3	24.4	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
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
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
17	20.3	21.6	22.8	24.0	25.3	26.5	27.8	29.1	30.3	31.6	32.8	34.1	35.4	36.7	38.0	39.3	40.6	41.9	43.2	44.5	45.8	47.2	48.5	49.8
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	46.4	47.8	49.1	50.5	51.9
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
20	24.9	26.2	27.5	28.8	30.1	31.4	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
21	26.5	27.8	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
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	44.7	46.2	47.6	49.0	50.5	51.9	53.4	54.8	56.3	57.8	59.3	60.7
23	29.9	31.3	32.7	34.1	35.4	36.8	38.2	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
24	31.7	33.1	34.5	35.9	37.3	38.8	40.2	41.6	43.1	44.6	46.0	47.5	49.0	50.5	51.9	53.4	55.0	56.5	58.0	59.5	61.1	62.6	64.2	65.8
25	33.5	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	60.4	62.0	63.6	65.2	66.8	68.4
26	35.5	36.9	38.4	39.9	41.3	42.8	44.3	45.8	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
27	37.4	38.9	40.4	41.9	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
28	39.5	41.0	42.6	44.1	45.7	47.2	48.8	50.4	52.0	53.6	55.2	56.9	58.5	60.1	61.8	63.5	65.2	66.9	68.6	70.3	72.0	73.7	75.5	77.3
29	41.6	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
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	72.8	74.7	76.5	78.3	80.2	82.1	84.0
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
32	48.7	50.4	52.1	53.8	55.6	57.3	59.1	60.9	62.7	64.5	66.3	68.1	70.0	71.9	73.8	75.7	77.6	79.5	81.5	83.5	85.4	87.5	89.5	91.5
33	51.2	53.0	54.7	56.5	58.3	60.1	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	93.5	95.7
34	53.9	55.7	57.6	59.4	61.3	63.1	65.0	66.9	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	100.1
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
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
37	62.9	64.9	66.9	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
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
39	69.9	72.2	74.4	76.6	78.9	81.3	83.6	86.0	88.4	90.9	93.3	95.9	98.4	101.0	103.6	106.3	109.0	111.8	114.5	117.4	120.3	123.2	126.1	129.2
40	73.8	76.2	78.5	80.9	83.3	85.7	88.2	90.7	93.3	95.9	98.5	101.2	103.9	106.7	109.5	112.4	115.3	118.2	121.2	124.2	127.3	130.5	133.7	137.0
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	135.3	138.8	142.3	145.9
42	82.5	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	123.3	126.7	130.1	133.6	137.1	140.8	144.5	148.3	152.2	156.1
43	87.6	90.4	93.2	96.0	98.9	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	155.1	159.4	163.8	168.2
44	93.1	96.1	99.1	102.2	105.4	108.6	111.9	115.3	118.7	122.3	125.9	129.6	133.4	137.4	141.4	145.5	149.7	154.1	158.5	163.1	167.8	172.7	177.7	182.9
45	99.3	102.5	105.8	109.2	112.6	116.2	119.8	123.6	127.4	131.3	135.4	139.6	143.9	148.3	152.9	157.6	162.4	167.4	172.6	177.9	183.5	189.2	195.1	201.2
46	106.3	109.8	113.4	117.2	121.0	125.0	129.1	133.3	137.6	142.1	146.7	151.5	156.5	161.6	166.9	172.5	178.2	184.2	190.4	196.8	203.5	210.4	217.8	225.4
47	114.3	118.3	122.4	126.6	130.9	135.4	140.1	145.0	150.0	155.3	160.7	166.4	172.3	178.5	185.0	191.8	198.9	206.3	214.2	222.4	231.0	240.0	249.5	259.5
48	123.9	128.4	133.1	137.9	143.0	148.3	153.9	159.7	165.8	172.2	178.9	186.0	193.5	201.4	209.8	218.7	228.2	238.2	248.9	260.2	272.3	285.1	298.7	313.0
49	135.5	140.8	146.4	152.3	158.5	165.0	172.0	179.3	187.2	195.6	204.6	214.3	224.7	235.9	248.1	261.3	275.5	290.9	307.6	325.5	344.8	365.4	387.3	410.6

Tabla E.2 de NMP (Continuación).

No.	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
	25.3	26.3	27.4	28.4	29.5	30.5	31.5	32.6	33.6	34.7	35.7	36.8	37.6	38.9	39.9	41.0	42.1	43.1	44.2	45.3	46.3	47.4	48.5	49.5
	26.6	27.6	28.7	29.7	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
	27.9	29.0	30.0	31.1	32.2	33.2	34.3	36.5	37.5	38.6	39.7	40.8	41.9	42.9	44.0	45.1	46.2	47.3	48.4	49.5	50.6	51.7	52.8	53.9
	29.3	30.3	31.4	32.5	33.6	34.7	35.7	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
	30.7	31.7	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
	32.1	33.2	34.3	35.4	36.5	37.6	38.7	39.8	41.0	42.1	43.2	44.3	45.5	46.6	47.7	48.9	50.0	51.2	52.3	53.5	54.6	55.8	56.9	58.1
	33.5	34.6	35.8	36.9	38.0	39.1	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
	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	58.2	59.4	60.6	61.8
	36.5	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	58.9	60.2	61.4	62.6	63.8
	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
	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	61.6	62.9	64.2	65.4	66.7	67.9
	41.4	42.6	43.8	45.0	46.3	47.5	48.7	49.9	51.2	52.4	53.6	54.9	56.1	57.4	58.6	59.9	61.2	62.4	63.7	65.0	66.2	67.5	68.8	70.1
	43.1	44.3	45.6	46.9	48.1	49.3	50.5	51.8	53.1	54.3	55.6	56.8	58.1	59.4	60.7	61.9	63.2	64.5	65.8	67.1	68.4	69.7	71.0	72.3
	44.9	46.1	47.4	48.6	49.9	51.2	52.4	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
	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
	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
	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
	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
	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
	56.8	58.2	59.6	61.0	62.4	63.9	65.3	66.7	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
	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	79.7	81.2	82.7	84.2	85.7	87.2	88.7	90.2	91.7	93.2
	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	81.0	82.6	84.2	85.8	87.4	89.0	90.6	92.2	93.8	95.4	97.1
	63.7	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
	65.3	67.8	69.4	71.0	72.5	74.1	75.7	77.3	78.9	80.5	82.1	83.8	85.4	87.1	88.7	90.4	92.1	93.8	95.5	97.2	98.9	100.6	102.3	104.1
	68.9	70.5	72.1	73.7	75.3	77.0	78.6	80.2	81.9	83.5	85.2	86.9	88.6	90.3	92.0	93.7	95.5	97.2	99.0	100.7	102.5	104.3	106.1	107.9
	71.7	73.3	75.0	76.6	78.3	80.0	81.6	83.3	85.0	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
	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
	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
	80.8	82.6	84.4	86.2	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
	84.2	86.1	87.9	89.8	91.7	93.6	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
	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	114.1	116.3	118.5	120.6	122.8	125.1	127.3	129.5	131.8	134.1	136.4
	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
	95.7	97.7	99.8	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
	100.0	102.2	104.4	106.6	108.9	111.2	113.5	115.8	118.2	120.5	122.9	125.3	127.8	130.3	132.8	135.3	137.8	140.4	143.0	145.6	148.3	150.9	153.6	156.4
	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	147.3	150.1	152.9	155.7	158.6	161.5	164.4
	109.7	112.2	114.6	117.1	119.6	122.1	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
	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	160.4	163.6	166.8	170.0	173.3	176.6	179.9	183.3
	121.3	124.0	126.8	129.6	132.4	135.3	138.2	141.2	144.2	147.2	150.3	153.5	156.6	159.9	163.1	166.4	169.8	173.2	176.7	180.2	183.7	187.3	191.0	194.7
	127.9	130.8	133.8	136.8	139.9	143.0	146.1	149.3	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	199.6	203.7	207.7
	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	188.6	192.7	196.8	201.0	205.3	209.6	214.0	218.5	223.0
	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	207.0	211.7	216.4	221.1	226.0	231.0	236.0	241.1
	153.2	157.0	160.9	164.8	168.9	173.0	177.2	181.4	185.8	190.3	194.8	199.5	204.2	209.1	214.0	219.0	224.2	229.4	234.8	240.2	245.8	251.5	257.2	263.1
	164.3	168.6	172.9	177.3	181.9	186.5	191.3	196.1	201.1	206.2	211.4	216.7	222.1	227.7	233.4	239.2	245.2	251.3	257.5	263.8	270.3	276.9	283.6	290.5
	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	325.6
	193.6	199.3	205.0	211.0	217.2	223.5	230.0	236.7	243.6	250.7	258.1	265.6	273.3	281.2	289.4	297.8	306.3	315.1	324.1	333.3	342.8	352.4	362.3	372.4
	214.1	220.9	227.9	235.1	242.7	250.4	258.4	266.7	275.3	284.1	293.2	302.6	312.3	322.3	332.5	343.0	353.8	364.9	376.2	387.9	399.8	412.0		

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. Revisar y registrar las temperaturas de las incubadoras diariamente, a fin de asegurarse que se encuentran dentro de los límites establecidos.

E.4.6.2. Deberá llevarse a cabo un control de calidad en cada nuevo lote de reactivo, el cual consiste del siguiente protocolo:

E.4.6.2.1. 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.

E.4.6.2.2. De cada cepa bacteriana, tomar una asada de 1µl de cada colonia e inocular un tubo de ensayo con 5mL de agua deionizada estéril. Cerrar y agitar completamente.

E.4.6.2.3. A continuación tomar una asada de 1µl 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.4.6.2.4. Comparar los resultados de esta prueba con los resultados esperados de la siguiente tabla:

Control	ATCC	Resultados esperados
E. faecium	335667	Fluorescencia
Serratia marcescens (Gram -)	43862	No fluorescencia
Aerococcus viridians (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 Normativo F.

Método aprobado 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 agar bilis esculina azida, precalentada a 44°C. Los enterococos intestinales hidrolizan la esculina, dando como producto final la 6, 7-dihidroxycumarina, que al combinarse con los iones Fe³⁺, 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, debe 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 1000 mL.

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

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

F.3.8. Propipeta.

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.

F.4.6. Incubadora, capaz de mantener una temperatura de 36°C ± 2°C con termómetro verificado y/o calibrado.

F.4.7. Incubadora, capaz de mantener una temperatura de 44°C ± 0.5°C con termómetro verificado y/o calibrado.

F.4.8. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.

F.4.8.1. 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 70 kPa). Cerrar la llave de paso tan pronto como la muestra haya sido filtrada. Es aconsejable enjuagar el embudo mediante la filtración de una a tres porciones de 10 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. Incubar las placas invertidas a 36°C ± 2°C durante 44h ± 4h.

F.4.8.2. Confirmación y Recuento. Las colonias típicas de enterococcos son elevadas, de color rojo, marrón o rosado. Si hay colonias típicas, transferir la membrana con pinzas estériles a una placa con agar bilis esculina azida. Incubar a 44°C ± 0.5°C durante 2h. Leer la placa inmediatamente después de la incubación. Las colonias típicas de enterococcos intestinales presentan un color marrón a negro alrededor de la colonia. Con ayuda de un cuenta colonias, seleccionar cajas que contengan entre 20 y 80 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.4.9. 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

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

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
100 mL	82 colonias
10 mL	11 colonias

$$Z = 82 + 11 = 93$$

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

y si V_s es por 100 mL:

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

$$110$$

F.4.10. Interpretación de resultados.

La presencia de colonias color marrón a negro alrededor de la colonia en agar bilis esculina azida, incubado a $44^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ durante 2h, se considera una prueba confirmativa de enterococos.

F.4.11. 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.

F.5. Informe de prueba.

F.5.1. Informar como: Enterococos intestinales UFC / 100mL.

F.5.2. Si se observan menos de 20 colonias, aplicar la fórmula 1 e informar como valor estimado.

F.5.3. 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 2.6).

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

F.5.4. En caso que se tengan placas con más de 80 colonias, informar como $>$ de 80 UFC/100mL.

F.6. MEDIOS DE CULTIVO.

F.6.1. Medio Slanetz y Bartley.

F.6.1.1. Medio base.

Ingredientes	Cantidad	
Triptosa	20,0g	
Extracto de Levadura	5,0g	
Glucosa	2,0g	
Fosfato dipotásico, K ₂ HPO ₄	4,0g	
Azida de Sodio NaN ₃	0.4g	
Agar	8 a 18g*	(* La cantidad de agar depende de la gelificación del agar)
Agua	1L	

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

F.6.1.2. 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.6.1.3. 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 $7,2 \pm 0,1$ 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.6.2. Agar bilis esculina azida.

Ingredientes	Cantidad
--------------	----------

Triptona	17,0g
Peptona	3,0g
Extracto de Levadura	5,0g
Bilis de buey deshidratada	10,0g
Cloruro de Sodio	5,0g
Esculina	1,0g
Citrato de Hierro III y amonio	0,5g
Azida de Sodio NaN ₃	0,15g
Agar	de 8 a 18g* (* Dependiendo de la gelificación del agar)
Agua	1L

Disolver los ingredientes en un L de agua y hervir. Esterilizar a $121^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. El pH después de la esterilización debe ser de $7,1 \pm 0,1$ a 25°C . Enfriar entre 50°C y 60°C . Distribuir en placas Petri para obtener un espesor de 3mm a 5mm. Dejar solidificar en una superficie horizontal. Conservar hasta 2 semanas a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Apéndice Normativo G.

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 ($0.45\mu\text{m}$). La membrana es colocada en agar mEI el cual contiene entre otros ingredientes, el comógeno indoxil- β -D- glucosido, que debido a la acción de la enzima β -D-glucosidasa sintetizada por los enterococos, producen un compuesto azul índigo alrededor de la colonia que se difunde en el medio.

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 1000 mL.

G.2.6. Filtros de membranas estériles de tamaño de poro de $0.45\mu\text{m}$.

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

G.2.8. Propipeta.

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.

G.3.6. Incubadora, capaz de mantener una temperatura de $41^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 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.****G.4.5. Agar mEI.****G.5. PROCEDIMIENTO.**

G.5.1. Consultar el inciso 2.5 y colocar la membrana en la superficie del agar mEI e incubar a $41^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Seleccionar cajas que contengan entre 20 y 60 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 por 24h 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 agar bilis esculina y a BHI y BHI con 6.5% de NaCl.

G.5.2.1. Incubar el agar bilis esculina 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 agar bilis esculina (producción 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.

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

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
100 mL	82 colonias

10 mL | 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

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 24 h, 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 (ver inciso 2.6).

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 $>$ de 80 UFC/100mL.

G.7. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

G.7.1. BHI.

G.7.1.1. Fórmula.

Infusión de cerebro de ternera	200.0g
Infusión de corazón de res	250.0g
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 mismo 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. BEA.

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 0.02g de cloruro de trifetil tetrazolium (TTC) al mEI y mezclar.

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 trifeniltetrazolium (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 9 X 50mm y de 4 a mm de espesor (aproximadamente de 4 a 6mL) y dejar solidificar. El pH final del medio deberá estar entre 7.1 ± 0.2. Conservar en refrigeración.

Apéndice Normativo H.

Método aprobado para la estimación de la densidad de Coliformes Fecales y *E. coli* por la técnica del número más probable presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua.

Este método es aplicable para la estimación de la densidad de Coliformes Fecales y *E. coli* por la técnica del número más probable 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 y para aquellos alimentos cuyas características particulares puedan interferir en la exactitud de la cuenta de UFC.

H.1. INTRODUCCIÓN.

Actualmente se utilizan tres grupos de indicadores microbianos con diferentes aplicaciones. La detección de bacterias coliformes se usa como indicador de la calidad sanitaria del agua o como indicador de las condiciones sanitarias en el procesamiento de alimentos. Los coliformes fecales y *E. coli* continúan siendo el indicador de elección que manifiesta contaminación fecal reciente o condiciones higiénicas inadecuadas. El método del número más probable consiste de una prueba presuntiva y confirmativa. El uso de las series de 3, 5 y 10 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/o crecimiento microbiano propiedad de los microorganismos coliformes para producir gas a partir de la fermentación de lactosa dentro de las 48h de incubación a 45,3± 0,2°C (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 *Shigellas* (44-58%) y *Salmonellae* (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: recirculación continua, tapa de dos aguas y termostato que evite variaciones mayores a 0.1°C.

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

H.2.3 Incubadora de 35°C ± 0.5°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.

H.2.8 Autoclave que alcance una temperatura de 121°C con termómetro y previamente evaluada con esporas de *Bacillus stearothermophilus*.

H.3. MATERIALES.

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

H.3.2 Campanas de fermentación de 5cm de largo por 5mm de diámetro (campanas de Durham).

H.3.3 Gradillas de plástico y metal.

H.3.4 Asas bacteriológicas de 3 a 3.5mm de diámetro con portaasa.

H.3.5 Lentes protectores.

H.3.6 Termómetros de inmersión parcial con división mínima de 0.5°C para incubadora calibrado y/o verificado.

H.3.7 Termómetro de máximas para autoclave con división mínima de 0.5°C calibrado.

H.3.8 Termómetro de inmersión total de 1 - 55°C de aproximadamente 55mm de longitud con subdivisiones de 0.1°C, calibrado.

H.3.9 Cinta testigo para procesos de esterilización por calor húmedo.

H.3.10 Vasos de licuadora estériles o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico.

H.3.11 Pipetas graduadas bacteriológicas de 1, 2, 5 y 10mL.

H.3.12 Probetas de 100, 500 y 1000mL.

H.3.13 Botellas de dilución de vidrio de borosilicato con tapa de rosca.

H.3.14 Frascos con capacidad 500mL con tapa de rosca.

H.3.15 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 Simmons.

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 Kovacs.

H.5.4 Reactivo de VP.

H.5.5 Indicador rojo de metilo.

H.5.6 Reactivos para la coloración de Gram.

H.5.7 Caldo EC – MUG.**H.6. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.****H.6.1 Procedimiento para determinar Coliformes Fecales y *E. coli* en agua y hielo.**

H.6.1.1 Prueba presuntiva. Agitar la muestra vigorosamente, la cantidad necesaria para el análisis deberá ser de 100mL como mínimo.

H.6.1.1.1 Agua para uso y consumo humano y envasada, transferir 5 porciones de 20mL, 10mL o una porción de 100mL. Consultar las tablas H.7.2.2, H.7.2.3 y H.7.2.4 para seleccionar las diferentes concentraciones de caldo lauril de acuerdo a los diferentes volúmenes de muestra a inocular.

H.6.1.1.2 Agua para uso recreativo. Utilizar 5 tubos de caldo lauril por cada porción de 10, 1 y 0.1mL, hacer diluciones decimales cuando se espere una densidad microbiana alta.

H.6.1.1.3 Hielo. Fundir el hielo a 45°C y realizar el análisis como agua para uso y consumo humano. Incubar los tubos de caldo lauril inoculados a $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$. 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.6.1.2 Prueba confirmativa. De cada tubo que muestre formación de gas, tomar una asada y sembrar en un número igual de tubos con el medio indicado para la prueba confirmativa; para bacterias coliformes totales, utilizar el caldo verde brillante lactosa bilis y para coliformes fecales utilizar EC. Inocular en tubos de EC un control positivo de *E. coli* y un control negativo de *Enterobacter aerogenes* e incubar con las muestras.

H.6.1.3 Incubar los tubos para prueba de coliformes totales a $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ por $48 \pm 2\text{h}$ y para la prueba de coliformes fecales a $45.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 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 respectivamente. Consultar la sección de cálculos.

Nota: Para todos los alimentos que se les determine coliformes fecales, la incubación debe ser a $45.5^\circ\text{C} \pm 0.2^\circ\text{C}$ por 24 a 48h, excepto para muestras de agua que deberán incubarse a $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ durante 24h.

H.6.1.4 Prueba complementaria.

H.6.1.4.1 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 $35^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ por $24\text{h} \pm 2\text{h}$. Observar las colonias típicas fermentadoras de color rojo que pueden estar rodeadas de un halo opaco de precipitación de sales biliares.

H.6.1.4.2 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 $35^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 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.6.1.4.3 Realizar tinción de Gram a partir del crecimiento en el agar nutritivo para observación de la morfología microscópica de las colonias.

H.6.1.4.4 La formación de gas en los tubos de caldo lauril sulfato dentro de las $48\text{h} \pm 3\text{h}$ y la observación de bacterias Gram negativas, en forma de bacilos no esporulados constituyen una prueba positiva a la presencia del grupo coliforme.

H.6.1.5 Prueba confirmativa para *E. coli* (por identificación bioquímica).**H.6.1.5.1 Prueba presuntiva.**

H.6.1.5.1.1 Tomar una asada de cada uno de los tubos positivos de caldo EC y sembrar por estría cruzada en agar EMB-L para su aislamiento. Incubar las placas invertidas a 35°C por 18-24h. Seleccionar dos colonias de cada plaza 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°C por 18 a 24h.

H.6.1.5.1.2 Si no hay colonias con morfología típica, probar una 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.6.1.5.1.3 Pruebas bioquímicas: Indol, Rojo de metilo, VP, citrato.

H.6.1.5.1.4 Producción de indol. Inocular un tubo con caldo triptona e incubarlo a $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ por $24 \pm 2\text{h}$. Adicionar 0.2 – 0.3mL de reactivo de Kovacs. La presencia de una coloración roja en la superficie del tubo se considera una prueba positiva.

H.6.1.5.1.5 VP. Inocular un tubo con caldo MR-VP e incubar a $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ por $48 \pm 2\text{h}$. Transferir 1mL a un tubo de 13 x 100mm. Adicionar 0.6mL de solución alfa naftol y 0.2mL de KOH al 40% y agitar. Se considera una prueba positiva cuando se desarrolla un color rojo rosado de 15 a 30 min.

H.6.1.5.1.6 Rojo de metilo. Inocular un tubo adicional con caldo MR-VP e incubar a $35^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ por $48 \pm 2\text{h}$. Adicionar 5 gotas de solución 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.6.1.5.1.7 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 Simmons 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 un cambio a coloración azul; la ausencia de crecimiento se considera una prueba negativa.

H.6.1.5.1.8 Interpretación de resultados de las pruebas bioquímicas.

H.6.1.5.1.9 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.6.1.5.1.10 Calcular el NMP de *E. coli* basada en la proporción de los tubos positivos de caldo EC confirmados. Consultar el H.7 Cálculos.

H.6.2 Prueba para detectar *E. coli* en alimentos refrigerados o congelados.

H.6.2.1 Prueba Presuntiva. Seguir lo indicado en el punto **Procedimiento para Alimentos**. 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 solo crecimiento y crecimiento con fluorescencia. Inocular los tubos por 24 a $48 \pm 2\text{h}$ 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.6.2.2 Prueba confirmativa. Confirmar todos los tubos positivos estriando en una placa de agar L-EMB, incubar a 35°C por 24h y continuar como en el punto.

H.6.2.2.1. Prueba confirmativa para *E. coli* (por identificación bioquímica). Calcular el NMP de *E. coli* basada en la confirmación de tubos en las 3 diluciones consecutivas.

H.6.3 Procedimiento para Alimentos.

H.6.3.1 Prueba Presuntiva. Pesar 25g o 50g del alimento en 225 o 450mL de regulador de fosfatos y moler 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 mantenerse en refrigeración ($2-5^\circ\text{C}$) 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.6.3.2 Preparar diluciones decimales con regulador de fosfatos. La cantidad de diluciones dependerá de la densidad de coliformes esperada. Agitar las diluciones 25 veces en un arco de 30cm por 7 seg transferir volúmenes de 1mL a 3 tubos con 10mL de caldo lauril sulfato de sodio 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 a 20 min.

H.6.3.3 Utilizar como medio de enriquecimiento caldo lauril triptosa, una vez inoculados incubar a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. 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.6.3.4 Prueba Confirmativa. Continuar como en el **H.6.1.2. Prueba Confirmatoria**, considerando que si la formación de gas no se observa, continuar la incubación 24h más.

H.7. CALCULOS.

H.7.1 Con frecuencia es necesario calcular el NMP con cantidades de muestra diferentes de los enlistados en las tablas H.7.4 desde el primer número de la combinación encontrada. Si la cantidad de muestra es mayor que 0,01g multiplicar el NMP enlistado en la tabla por 10.

H.7.2 Una determinación de 5 tubos que dé 3 tubos positivos en 0.01g; 2 tubos positivos en 0.001g y 1 tubo positivo en 0.0001g (3-2-1) el resultado obtenido al leer en la tabla 7.4.1, es 17, multiplicar por 10 para así obtener 170 como el NMP final por gramo 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 3 tubos para *Salmonella spp* que de 3 tubos positivos en 1g; 1 tubo positivo en 0.1g y ningún positivo en 0,01g (3 - 1 - 0) el resultado obtenido al leer en la tabla H.7.4.2 es 43 y dividir entre 10, lo que da 4,3 como el NMP presuntivo por gramo de muestra.

H.7.3 Un método alternativo para obtener el número más probable 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.7.4 Tablas.

H.7.4.1 Tabla 1. NMP para 1g de muestra cuando se usan 3 tubos con porciones de 0.1; 0.01 y 0.001g.

Tubos Positivos				Tubos Positivos				Tubos Positivos				Tubos Positivos			
0.1 mL	0.01 mL	0.001 mL	NMP	0.1 mL	0.01 mL	0.001 mL	NMP	0.1 mL	0.01 mL	0.001 mL	NMP	0.1 mL	0.01 mL	0.001 mL	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.7.4.2 Tabla 2. NMP para 100mL de muestra cuando se usan 5 porciones en cada una de 3 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	1mL	0.1mL	NMP	10mL	1mL	0.1mL	NMP	10mL	1mL	0.1mL	NMP	10mL	1mL	0.1mL	NMP	10mL	1mL	0.1mL	NMP	10mL	1mL	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	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: Official Methods of Analysis of AOAC Internacional, 18 ed. 2005. Chapter 17.3, pag. 40

H.7.4.3 Tabla 3. NMP 100mL de muestra de agua o hielo e intervalos de confianza del 95%, utilizando 5 tubos con 20mL de muestra.

Tubos Positivos	NMP/100 mL	95% de Límite 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.7.4.4 Tabla 4. NMP por gramo de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando 10 tubos con 10mL de muestra.

Tubos positivos	NMP/100mL	Límite de confianza	
		Inferior	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: American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th edition 1998. Washington DC.

H.7.4.5 Tabla 5. NMP por gramo de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando 3 tubos con 0.1, 0.01 y 0.001g de muestra.

Número más probable por gramo de muestra e intervalos 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	
0,10	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 Edition, Revision A, 1998. Actualización diciembre 2003.

H.7.4.6 Tabla 6. NMP por gramo de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando 5 tubos con 0,1, 0,01 y 0,001 g de muestra.

NMP por gramo de muestra e intervalos de confianza del 95 %, utilizando 5 tubos con 0,1; 0,01 y 0,001g de muestra.											
No. Tubos positivos			NMP/g	Limite de confianza		No. Tubos positivos			NMP/g	Limite 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	36	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	1.100
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	36	5	5	4	1600	400	4600
						5	5	5	>1600	700	--

Bacteriological Analytical Manual. Appendix 2. Most Probable Number for Serial Dilutions. FDA. Online. Octubre 2010.

H.7.4.7 Tabla 7. NMP por gramo de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando 5 tubos con 0.1, 0.01 y 0.001 g 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		No. 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	<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

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		No. 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	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

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	Limite de confianza		No. tubos positivos			NMP/g	Limite de confianza	
0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior
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
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

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		No. tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza	
0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior
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	--

Bacteriological Analytical Manual, FDA, 8th Edition, Revision A, 1998. Actualización diciembre 2003.

H.7.4.8 Tabla 8. NMP por 100mL de muestra inoculando tubos de cada una de tres diluciones geométricas.

Tubos Positivos				Tubos Positivos				Tubos Positivos				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
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.7.5 ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD MICROBIANA POR LA TÉCNICA DE NMP. Uso de tablas de NMP con 95% de límite de confianza.

H.7.5.1 Las tablas H.7.4.5, H.7.4.6, H.7.4.7 presentan la estimación estadística de los valores del NMP que corresponden al 95% de límite de confianza cuando se utilizan 3, 5 y 10 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 Cálculo aproximado del NMP y el 95% de Límite de Confianza) para tener el NMP aproximado (para las combinaciones de 3 y 5 tubos).

H.7.5.2 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.7.5.3 Cuando se preparan más de 3 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 2 siguientes diluciones mayores (A y B en los ejemplos H.7.5.3.1 y H.7.5.3.2). 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 (C de los ejemplos H.7.5.3.1 y H.7.5.3.2). 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 (D de los ejemplos H.7.5.3.1 y H.7.5.3.2). Cuando todos los tubos

de todas las diluciones son positivos seleccionar las tres diluciones más altas. (E de los ejemplos H.7.5.3.1 y H.7.5.3.2).

H.7.5.3.1 Ejemplo para determinar el NMP estimado en series de tres 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/100 g (mL).

H.7.5.3.2 Ejemplo para determinar el NMP estimado en series de 5 tubos con 1 g (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

^aNumerador/denominador = número de tubos positivos/número de tubos inoculados.

^bMultiplicar todos los valores de NMP/g (mL) por 100 para expresarlos como NMP/100 g (mL).

H.8. CÁLCULO APROXIMADO DEL NMP Y EL 95% DE LÍMITE DE CONFIANZA.

H.8.1 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 3, 5 y 10 tubos por dilución, incluso usando un método aceptado, pueden presentarse datos irregulares o accidentes de laboratorio que causan pérdida de 1 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:

$$\underline{P} = (5 + 4 + 2 + 1) = 12;$$

$$\underline{N} = (8 \times 0) + (4 \times 1) + (2 \times 3) + (1 \times 5) + (0,5 \times 4) + (0,25 \times 5) = 18,25; \text{ y}$$

$$\underline{I} = 5 (8 + 4 + 2 + 1 + 0,5 + 0,25) = 78,75$$

$$\text{NPM/g} = 12 / (18,25 \times 78,75)^{1/2} = 0,32/\text{g} \text{ o } 32/100 \text{ g.}$$

Los límites de confianza del 95% estimados, pueden obtenerse del antilogaritmo de base 10 con la siguiente ecuación:

$$\log (\text{NMP/g}) \pm 1,078 [(\log a)/n]^{1/2}$$

$$\text{Log (NMP/g)} \pm (1,96) (0,55)$$

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.9. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

H.9.1 Expresar en NMP/g o mL para alimentos y NMP/100mL para agua.

H.9.2 Cuando se obtienen resultados negativos (ausencia de gas en los tubos), informar el límite de detección que corresponde a menos de una vez el valor más bajo del NMP de la tabla utilizada. Excepto en los casos de agua para uso y consumo humano que por acuerdo internacional se informa como "No detectable" o "ND".

H.10. MEDIDAS DE CONTROL DE CALIDAD.

H.10.1 Verificar la funcionalidad del procedimiento analítico mediante cultivos control con cepas de *E. coli* y *E. aerogens* para coliformes fecales y *E. coli* y *K. pneumoniae* para la determinación de *E. coli* con caldo EC-MUG.

H.10.2 Cuando el ingreso de muestras para esta determinación sea frecuente, analizar un duplicado cada mes; si el ingreso no es frecuente, realizar un duplicado cada 10 muestras.

H.10.3 Registrar las temperaturas de incubación con termómetros verificados.

H.10.4 Pesar la muestra en balanza calibrada y verificada.

H.10.5 Verificar el ciclo de esterilización de autoclaves con indicador biológico y termómetro de máximas calibrado o verificado.

H.10.6 Verificar el ciclo de esterilización de hornos con indicador biológico.

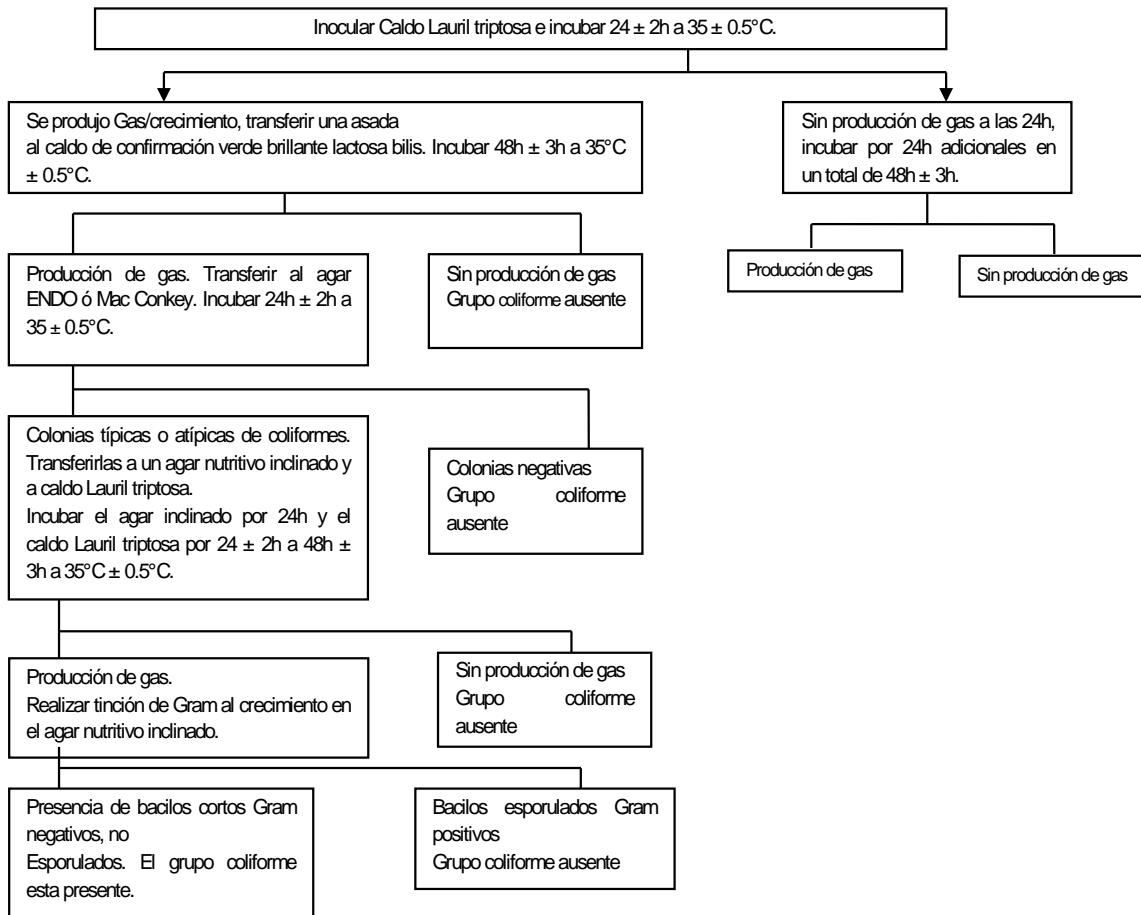
H.10.7 Realizar control de medios de cultivo con cepas tipo (evaluación biológica) y evaluación física.

H.10.8 Realizar control ambiental por el método de sedimentación.

H.11. VALIDEZ DE LA PRUEBA.

H.11.1 Si el crecimiento de los controles no es característico la prueba se invalida.

H.11.2 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. Diagrama de Flujo.**H.13. Preparación de Medios de Cultivo.****H.13.1 Caldo A-1.****H.13.1.1. Fórmula.**

Este medio se debe preparar a partir de ingredientes:

Lactosa	5,0g
Triptona	20,0g
Cloruro de sodio	5,0g
Salicina	0,5g
Eter <i>p</i> -isocetilfenil polietilen glicol (Tritón X-100)	1,0mL
Agua destilada	1000mL

H.13.1.2. Preparación: Calentar los ingredientes hasta su disolución, agregar 1mL del Tritón X-100 y ajustar el pH a $6,9 \pm 0,1$. Para alícuotas de 10mL preparar y utilizar el medio a doble concentración. Para lograr aproximadamente el mismo nivel del medio e inóculo en todos los tubos, distribuir porciones de 10mL

del caldo en tubos de 18 x 150mm. Los tubos deben contener campanas de Durham; usar tubos de 22 x 175mm para el caldo a doble concentración. Esterilizar en autoclave a 121°C por 10 min y guardar el medio a temperatura ambiente en un lugar oscuro por no más de 7 días. La formación de precipitado particularmente en los tubos de doble concentración, no afecta el desempeño.

Nota: Debido a que las diferencias geográficas pueden afectar el desempeño del método medio A-1, antes de empezar a utilizarlo determinar su comparabilidad con el método de tubos Lauril Sulfato – Caldo EC. Más aun, el medio A-1 debe prepararse a partir de sus ingredientes individuales.

H.13.2 Caldo Lauril Triptosa.

H.13.2.1. 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	1000,0mL
pH final: 6,8 ± 0,2 a 25°C.	

H.13.2.2. Preparación: Disolver los ingredientes en un L de agua destilada, ajustar el pH si es necesario y distribuir en tubos de ensaye 16 X 150mm con campanas de Durham de 5 x 45mm. 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 medio por tubo (mL)	Volumen de medio más inóculo (mL)	Caldo Lauril Triptosa requerido g/l
10 o más	11 o más	35,6
10	20	71,2
20	30	53,4
10	30	106,8
50	150	106,8
35	135	137,1
20	120	213,6

H.13.3 Caldo EC.

H.13.3.1. 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	1000,0mL
pH final: 6,9 ± 0,2 a 25°C.	

H.13.3.2. Preparación: Disolver los ingredientes en un L de agua destilada, dejar en reposo durante 5 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 16 x 150 mm con campanas de Durham de 5 x 50mm y esterilizar en autoclave durante 15 min a 121°C.

H.13.4 EMB-L

H.13.4.1. 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.13.4.2. Preparación: Disolver la peptona, el fosfato y el agar en un L de agua, calentar hasta ebullición para la disolución completa, distribuir en porciones de 100 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.13.5 Caldo triptona al 1 %.

H.13.5.1. Fórmula.

Triptona o tripticasa	10g
Agua destilada	1000mL
pH final: 6,9 ± 0,2	

H.13.5.2. Preparación: Disolver los ingredientes, distribuir en porciones de 5mL en tubos de ensaye de 16 x 125 o 16 x 150mm y esterilizar a 121°C por 15 min.

H.13.6 Caldo MR – VP.

H.13.6.1. 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	

o

Peptona	5g
Glucosa	5g
Regulador de Fosfatos	5g
Agua destilada	1000mL

pH 7.5 ± 0.2

H.13.6.2. Preparación: Disolver los ingredientes con calentamiento suave si es necesario, distribuir en volúmenes de 10mL en tubos de ensaye de 16 x 150mm y esterilizar a 121°C por 15 min.

H.13.7 Caldo Citrato de Koser.

H.13.7.1. 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 97ódio •2H ₂ O	3,0g
Agua destilada	1000mL

H.13.7.2. 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.13.8 Citrato de Simmons.**H.13.8.1. 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 98ódio •2H ₂ O	3,0g
NaCl	5,0g
Agar	5g
Azul de bromotimol	0,08g
Agua destilada	1000mL

H.13.8.2. 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 3 cm.

H.13.9 Regulador de fosfatos solución concentrada.**H.13.9.1. Fórmula.**

KH₂PO₄	34g
Agua destilada	500mL

H.13.9.2. Preparación: Solución concentrada: Disolver el fosfato en 500mL de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1,0N, llevar a un L 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 un L con agua. Distribuir en porciones de 99, 90 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.13.10. Diluyente de peptona al 0.1 %.**H.13.10.1. Fórmula.**

Peptona	1g
Agua destilada	1000mL
pH: 7,0 ± 0,2	

H.13.10.2. Preparación: Disolver la peptona en el agua destilada y esterilizar a 121°C por 15 min.

H.13.11. Reactivo de Kovacs.**H.13.11.1 Fórmula.**

p-dimetilaminobenzaldehído	5g
Alcohol amílico (normal)	75mL
HCl concentrado	25mL

H.13.11.2. Preparación: Disolver el p-Dimetilaminobenzaldehído en alcohol amílico normal, adicionar lentamente el HCl. Almacenar a 4°C.

H.13.12 . Reactivo de VP.

H.13.12.1. Fórmula.

Solución 1.

alfa-naftol	5g
Alcohol Absoluto	100mL

Solución 2.

KOH	40g
Agua destilada	Para llevar a 100mL

H.13.13 . Indicador rojo de metilo.

H.13.13.1.Fórmula.

Rojo de metilo	0,10g
Etanol al 95%	300mL
Agua destilada	Para completar 500mL

H.13.13.2. Preparación: Disolver el rojo de metilo en 300mL de etanol y aforar a 500mL con agua destilada.

H.13.14. Reactivos para la coloración de Gram.

H.13.14.1 Cristal Violeta.

H.13.14.1.1. Fórmula.

Solución A.

Cristal violeta (colorante 90%)	2g
Etanol 95%	20mL

Solución B.

Oxalato de amonio	0,8g
Agua destilada	80mL

H.13.14.1.2. Preparación: Mezclar la solución A y B y filtrar a través de un papel filtro. Almacenar por 24h.

H.13.14.2 Iodo.

H.13.14.2.1. Fórmula

Iodo	1g
Ioduro de potasio (KI)	2g
Agua Destilada	300mL

H.13.14.2.2. Preparación: Colocar el KI en un mortero, adicionar el iodo, triturar con el pistilo por 5 a 10 seg, 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.13.14.3 Colorante de contraste (solución concentrada).

H.13.14.3.1. Fórmula.

Safranina	2,5g
-----------	------

Etanol al 95%

100mL

H.13.14.3.2. Preparación: Solución de trabajo: Adicionar 10mL de la solución concentrada a 90mL de agua destilada.

H.13.14.4 Caldo EC – MUG

H.13.14.4.1. Preparación: Preparar el caldo EC y adicionar 50mg de 4-metilumbelliferyl-beta-D-glucuronido (MUG) por L antes de esterilizar (121°C por 15 min). El caldo EC-MUG está comercialmente disponible.

Apéndice normativo I.

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 5 tubos por dilución, en caldo glutamato con minerales modificado e incubado a 37±1°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-D glucuronido y detectar la actividad de -glucuronidasa incubado a 44±1°C por 22 ±1°C.

I.2. EQUIPO.

I.2.1 Emplear el equipo e instrumentos de laboratorio habituales incluyendo.

I.2.2 Homogeneizador peristáltico y bolsas.

I.2.3 Motor homogeneizador rotatorio) y vasos de licuadora.

I.2.4 Gabinete de flujo laminar (clase II).

I.2.5 Refrigerador a 3°C ± 2°C.

I.2.6 Material de vidrio estéril.

I.2.7 Cuchillos desconchadores, tijeras, pinzas, espátulas estériles.

I.2.8 Mechero Bunsen.

I.2.9 Guantes de látex.

I.2.10 Incubadora a 37°C ±1°C y a 44°C ± 1°C.

I.2.11 Asas bacteriológicas.

I.2.12 Pipetas de 1mL, 2mL y 10mL.

I.3. MATERIALES.

I.3.1 Cajas Petri desechables 15mm x 100mm.

I.3.2 Tubos de ensaye 18mm x 200mm y de 16mm x160mm 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.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

I.5. CULTIVOS DE REFERENCIA.

I.5.1 *E. coli* ATCC 25922 o ATCC 8739.

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 la 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 a 27° (temperatura del laboratorio) por máximo de 3h o a 2°C ± 2°C por de 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 con la manos 25 veces en un arco de 25cm 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 del 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 de reactivas de pH. Para lo cual es necesario adicionar NaOH (0.1 M) 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 año 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 y 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 ± 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

75 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 2 partes de diluyente y homogeneizar en homogeneizador rotatorio por 30 seg 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 6 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 de cuerpo del pescado incluyendo la piel. Preparar una suspensión 1:2 con el diluyente y homogeneizar 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 60 min de 18 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. Tomas porciones en cubo de la muestra retirando la piel.

I.6.20 Productos marinados. Para productos acidificados bajar el pH.

I.6.21 Pescados empanizados, surimi, crustáceos y moluscos delicatessen. Tomar porciones representativas de la muestra y diluir 1:10.

I.6.22 Platillos 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 1 h a 18- 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 1 h a 18- 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 1 h a 18-27°C (temperatura ambiente) para que el bloque se pueda romper, extraer con pinzas o tijeras estériles. Mezclar las piezas con un homogeneizados rotario.

I.6.27 Filetes de pescado congelado en bloques. Tomar una muestra perforando el bloque o permitir que se descongele de 18 a 27°C por 1 h y tomar porciones con pinzas estériles o dejar que se descógele 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 1 h a 18- 27°C (temperatura ambiente) para que el bloque se pueda romper, rebanadas con cuchillo bien afilado estéril por la mitad del bloque.

I.6.29 Porciones pequeñas de pescado congeladas individuales. Descongelar poco a poco por 1 hora a 18- 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 18-27°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 9 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 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 medios 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 de las diluciones decimales siguientes no debe ser mayor a 30 min a menos que se especifique otra cosa.

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).

I.7.3 Agar bilis glucuronido (TBGA segundo medio selectivo).

I.8. PROCEDIMIENTO, INOCULACIÓN DEL ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO.

I.8.1 En caso general inocular 3 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 5 tubos por dilución. Tomar 3 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 3 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°C ± 1°C por 24h ± 2h.

I.8.3 Para cada tubo inoculado que muestre presencia coloración amarilla estriar con un asa a una placa de agar tripton bilis glucuronido para obtener colonias aisladas.

I.8.4 Incubar las placas a 44°C ± 1°C por 24h ± 2h 14.

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 palca 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 número más probable 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 gramo 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 3 tubos por dilución. Por lo que los resultados obtenidos deben ser usados con precaución. Cuando se use las series de 5 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 se encuentran en las tablas.

Ejemplo:

Para una muestra sólida, en el 95% de los casos los límite de confianza varían de 13 a 200 *E.coli* glucuronidasa positiva 7.4×10^1 NMP por gramo y de 4 a 99 *E.coli* glucuronidasa positiva en NMP 2.4×10^1 por gramo.

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 especificado en la técnica.

I.12.1.5 Los resultados obtenidos y/o si la repetitividad se ha realizado.

No. de tubos positivos			NMP/g	Limite de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Limite de confianza	
0.1	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	--

Tabla I.2. NMP por gramo de muestra e intervalos de confianza del 95 %, utilizando 5 tubos con 0,1, 0,01, y 0,001 g de muestra.

No. Tubos positivos			NMP/g	Limite de confianza		No. Tubos positivos			NMP/g	Limite 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	36	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	1,100
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	36	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

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- -D- glucuronido ácido (BCIG)	144 μmol^{a}
Dimetil sulfoxido (DMSO) ^b	3mL
Agar	9 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 12 a 15mL en placas Petri estériles y dejar secar. Las placas pueden ser almacenadas a 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.