**B.1 Precauciones generales de seguridad.**

**B.1.1** El analista debe consultar siempre la información respecto a la exposición y manejo seguro de los reactivos químicos especificados en estos métodos, para emplear el equipo de seguridad apropiado como bata de laboratorio, guantes de látex, anteojos de seguridad, mascarilla, etc. y trabajar cuando así se requiera bajo campana de extracción.

**B.1.2** Para la aplicación de los siguientes métodos analíticos se debe cumplir con las Buenas Prácticas de Laboratorio.

**B.2 DETERMINACION DE MATERIA EXTRAÑA EN PESCADO (ENLATADO) Y PRODUCTOS DE LA PESCA FRESCOS REFRIGERADOS Y CONGELADOS.**

**B.2.1 Principio del método.**

La materia extraña se separa por flotación y posteriormente se filtra para su observación al microscopio.

**B.2.2 Equipo.**

**B.2.2.1** Balanza granataria con una precisión de 0,1 g

**B.2.2** Microscopio binocular estereoscópico con objetivos que pueden ser de 3, 6, 7 y 10 X y oculares apareados de amplio campo visual de 10, 30 y 100 X respectivamente.

**B.2.2.3** Equipo de filtración al vacío.

**B.2.2.4** Lámpara para el microscopio o luz natural equivalente.

**B.2.2.5** Parrilla de calentamiento con agitación magnética.

**B.2.3** **Materiales.**

**B.2.3.1** Percolador de 2 L.

**B.2.3.2** Matraz de 1,5 L

**B.2.3.3** Embudo Buchner.

**B.2.3.4** Vaso de precipitado de 600 mL.

**B.2.3.5** Papel de filtración rápida rayado para conteo con líneas paralelas de aproximadamente 5 mm de separación.

**B.2.3.6** Material de uso común en el laboratorio.

**B.2.4 Reactivos.**

**B.2.4.1** Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua se entiende agua destilada.

**B.2.4.2** Isopropanol (C3H8O)

**B.2.4.3** Acido clorhídrico (HCl)

**B.2.4.4** Aceite mineral. Aceite de parafina, blanco y ligero. Con un peso específico de 0,840-0,860 (25 ºC)

**B.2.4.5** Solución detergente al 5%

**B.2.5 Procedimiento.**

**B.2.5.1** Pesar 225 g de muestra y transferir a un matraz de 1,5 L. Romper los grumos con espátula. En el caso de productos enlatados, lavar la lata completamente con pequeñas cantidades de isopropanol y adicionar estos lavados al matraz.

**B.2.5.2** Añadir 50 mL de HCl y llevar a un volumen de 800 mL con agua. Agitar magnéticamente y llevar a ebullición durante 20 minutos (si el producto forma espuma adicionar agua ocasionalmente)

**B.2.5.3** Adicionar 50 mL de aceite mineral y agitar magnéticamente durante 5 minutos manteniendo la ebullición.

**B.2.5.4** Transferir al percolador el cual previamente contiene aproximadamente 250 mL de agua. Mantener el matraz de 1,5 L para llenar el percolador con agua durante los ciclos de rellenado.

**B.2.5.5** Llenar el percolador con agua caliente (55-70ºC) a unos 3 cm de la parte superior. Dejar en reposo durante 3 minutos y drenar el contenido a aproximadamente 3 cm de la parte más baja de la capa de aceite (si existen grandes cantidades de sólidos suspendidos, dejar más tiempo en reposo para permitir la separación del aceite)

**B.2.5.6** Repetir el drenado y las etapas de rellenado a intervalos de 3 minutos hasta que la fase acuosa esté clara. Finalmente drenar el percolador lentamente a un volumen mínimo de fase acuosa sin perder la fase oleosa.

**B.2.5.7** Drenar la fase oleosa a un matraz de 600 mL. Lavar el percolador con agua caliente, con solución detergente al 5%, agua e isopropanol en secuencia, usando aproximadamente 50 mL por cada lavado.

**B.2.5.8** Colectar los lavados en el matraz de 600 mL. Filtrar a través del papel y observar al microscopio.

**B.2.5.9** Informe de la prueba.

**B.3. BIOENSAYO PARA TOXINA PARALIZANTE EN MOLUSCOS BIVALVOS.**

**B.3.1 Materiales**

**B.3.1.1** Ratones machos albinos, sanos, cepa Webster Suiza, con un peso de 19 a 21 gramos. Los animales que pesan de 17 a 19 y de 21 a 23 gramos también pueden ser utilizados en ausencia de animales con el intervalo de peso deseado. No reutilizar ratones sobrevivientes.

**B.3.1.2 Reactivos**

**B.3.1.2.1** Solución patrón de saxitoxina de100 µg/mL.

**B.3.1.2.2** Solución de referencia de saxitoxina de1 µg/mL

**B.3.1.2.3** Medir 1 mL de solución patrón en un matraz volumétrico de 100 mL, y llevar al volumen con agua destilada acidificada con HCl (pH=3). Esta solución es estable por varias semanas si se almacena a 3 o 4 °C y el pH está entre 2,0 y 4,0.

**B.3.1.2.4** Soluciones de ácido clorhídrico 0,5 N y 0,18 N.

**B.3.2 Procedimiento**

**B.3.2.1** Precaución: Usar guantes de hule, cuando se manipulen materiales que puedan contener toxina paralizante de los moluscos.

**B.3.2.2** Acondicionamiento del bioensayo.

**B.3.2.3** Diluir alícuotas de 10 mL de la solución de referencia con 10, 15, 20, 25 y 30 mL de agua, respectivamente. Posteriormente inyectar 1 mL de cada dilución por vía intraperitoneal a unos cuantos ratones de prueba.

**B.3.2.4** La mediana del tiempo de muerte debe estar entre 5 y 7 minutos. El pH de las diluciones debe estar entre 2 y 4 y en ningún caso debe ser mayor a 4,5.

**B.3.2.5** Probar diluciones adicionales con incrementos de 1 mL de agua destilada. Por ejemplo, si la alícuota de 10 mL diluidos con 25 mL de agua mata a los ratones en 5 a 7 minutos, preparar soluciones 10 + 24 y 10 + 26.

**B.3.2.6** Inyectar a un grupo de 10 ratones con 2 diluciones (de preferencia 3), que estén dentro del tiempo entre 5 a 7 minutos. Aplicar dosis de 1 mL por vía intraperitoneal a cada ratón.

**B.3.2.7** Registrar el tiempo de inyección y de muerte lo más aproximado posible a intervalos de 5 segundos. Si se registran 7 segundos, redondear a 5 segundos. Si se registran 8 segundos redondear a 10 segundos. El tiempo de muerte es el tiempo transcurrido entre el término de la inyección y el último jadeo del ratón.

**B.3.2.8** Pesar y anotar el peso de los 10 ratones, aproximando hasta 0,5 gramos e inyectar cada uno con 1 mL de 2 o 3 diluciones de preferencia que provoquen la muerte en una mediana de tiempo de 5 a 7 minutos.

**B.3.2.9** Anotar los tiempos de muerte. Si más ratones de un grupo de 10 sobrevive a la inyección de una dilución en particular de la solución de referencia, repetir la inyección en un nuevo grupo de 10 ratones.

**B.3.2.10** Antes de proceder a realizar la prueba con el segundo grupo, investigar las variables del procedimiento que pudieron haber provocado los resultados iniciales, tales como filtración, derrame de la mezcla inyectada en el ratón o el no haber inyectado el volumen completo de la solución patrón.

**B.3.2.11** Cálculo del factor de corrección (FC)

**B.3.2.12** Determinar la mediana del tiempo de muerte para cada grupo de 10 ratones usados con cada dilución. Descartar los resultados para cada grupo de 10 ratones que den una mediana de muerte menor de 5 o mayor de 7 minutos. Si cualquier grupo de 10 ratones produce una mediana de tiempo de muerte en el intervalo de tiempo mencionado, incluir todos los grupos de 10 ratones usados para que los cálculos de la dilución subsecuente o algunas muertes estén en el intervalo deseado.

**B.3.2.13** Usar los tiempos de muerte por cada ratón y para cada grupo, en el cual la mediana de tiempo de muerte quede entre 5 y 7 minutos. Determinar las Unidades Ratón correspondientes a partir de la tabla de Sommer's.

**B.3.2.14** Con el peso de cada ratón se determina el factor de corrección en la tabla de correcciones de pesos de ratones. Multiplicar las Unidades Ratón por el factor de conversión del peso para determinar los valores para las Unidades Ratón corregidas por mL de las diluciones seleccionadas. Dividir los µg de toxina/mL calculados en las diluciones seleccionadas por las URC asociadas y así obtener el factor de conversión.

**B.3.2.15** Calcular el promedio de FC individuales. El valor resultante es útil para verificar los ensayos de rutina. Este valor representa los microgramos de veneno equivalentes a una UR.

**B.3.2.16** Los valores individuales del FC obtenidos en el laboratorio, pueden variar significativamente si no existe un control absoluto de la técnica. Por lo regular el uso de patrones de referencia o patrones secundarios, depende del volumen de ejecución del trabajo de ensayo.

**B.3.3 Uso de patrones en el ensayo de rutina de Moluscos Bivalvos.**

**B.3.3.1** Verificar los valores del FC periódicamente como sigue: si los moluscos son analizados menos de una vez a la semana, determinar el valor del FC cada día que el ensayo sea ejecutado. Para ello inocular 5 ratones con una dilución apropiada de la solución patrón. Si los ensayos se realizan durante varios días a la semana, verificar solamente una vez por semana la dilución cuya mediana de tiempo de muerte esté entre 5-7 minutos. El FC así determinando debe quedar dentro de ±20% el FC estándar predeterminado.

**B.2.3.2** Si los resultados no concuerdan, verificar el FC sobre una base de 10 ratones formado por la adición de 5 ratones inoculados con la misma dilución de solución patrón de saxitoxina e incluir los resultados a los 5 ratones originales.

**B.3.3.3** Inocular un segundo grupo de 10 ratones. El promedio de valores del FC obtenidos de los 6 grupos de 10 ratones representa un nuevo valor de FC.

**B.3.3.4** Repetir la verificación de los valores de FC de manera que los resultados sean consistentes dentro del ±20%. Si se encuentran grandes variaciones, investigar la posibilidad de controlar y reconocer otras variables que afectan al método antes de proceder con los análisis de rutina.

**B.3.4 Preparación de la muestra**

**B.3.4.1** Almejas, ostiones y mejillones.

**B.3.4.1.1** Lavar los moluscos bivalvos con agua potable retirando la arena y cualquier material extraño. Desconchar la carne con cuidado, sin lesionar el cuerpo del molusco. Colectar aproximadamente 150 g de carne sobre un tamiz del número 10 y dejar escurrir durante 5 minutos. Descartar las conchas, moler la carne en una mezcladora o licuadora hasta su homogenización.

**B.3.4.2** Escalopas.

**B.3.4.2.1** Separar la porción comestible (músculo aductor) y solamente aplicar la prueba a esta porción. Drenar y moler como se describió anteriormente

**B.3.4.3** Extracción de la saxitoxina.

**B.3.4.3.1** Pesar 100 gramos de carne homogenizada en un vaso de precipitados tarado.

**B.3.4.3.2** Agregar 100 mL de solución de ácido clorhídrico 0,18 N, agitar y verificar el pH, el cual debe estar entre 2 y 4, y de preferencia 3.

**B.3.4.3.3** Calentar la mezcla, hervir 5 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente. Ajustar la mezcla enfriada a un pH 2,0-4,0 (nunca mayor a 4,5)

**B.3.4.3.4** Verificar el pH con indicador universal BDH, azul de fenol, papel rojo congo o con un potenciometro. Para bajar el pH, agregar solución de HCl 5 N por goteo, agitando constantemente para evitar la destrucción de la toxina.

**B.3.4.3.5** Transferir la mezcla a una probeta graduada y diluir a 200 mL. Regresar la mezcla a un vaso de precipitados, agitar para homogenizar y dejar reposar hasta que una parte del sobrenadante sea translúcido y pueda encontrarse libre de partículas sólidas capaces de "tapar" una aguja hipodérmica del número 26.

**B.3.4.3.6** Si es necesario centrifugar el sobrenadante 5 minutos a 3000 rpm o filtrar por papel. Filtrar solo la cantidad de líquido necesario para el bioensayo.

**B.3.5 Prueba de bioensayo en ratón**

**B.3.5.1** Pesar 3 ratones, anotando el peso para cada muestra que va a ser analizada. Inyectar por vía intraperitoneal a cada ratón l mL de extracto centrifugado. Este es el punto crítico del bioensayo. Si las inyecciones no se hacen directamente en la cavidad peritoneal el tiempo de muerte no es reproducible.

**B.3.5.2** Descartar cualquier ratón en donde se pierda o se filtre más de una gota de extracto. Activar el cronómetro en el momento de la inyección y mantener la observación cuidadosamente, hasta el tiempo de muerte, que se manifiesta por el último jadeo del animal.

**B.3.5.3** Registrar el momento de la muerte de cada ratón. Si la mediana de tiempo de muerte es de 5 minutos, diluir el extracto con HCl 0,01 N, e inyectar otro lote de ratones hasta obtener los tiempos de muerte entre 5 y 7 minutos. Si la mediana del tiempo de muerte con el extracto no diluido es mayor a 7 minutos, el dato puede ser utilizado para determinar la toxicidad de la muestra.

**B.3.5.4** Determinar la UR/mL de extracto que corresponde a los tiempos de muerte observados de la tabla de corrección de pesos de ratones.

**B.3.5.5** Calcular las URC, multiplicando las UR correspondientes al tiempo de muerte de cada ratón por el factor de corrección del peso obtenido en la tabla de corrección de pesos de ratones.

**B.3.6 Expresión de resultados.**

**B.3.6.1** Cálculos

µg saxitoxina/100g carne de molusco = Mediana URC/mL x FC x FD x 200

En donde:

FC = Factor de conversión

FD = Factor de dilución

**Tabla de corrección de pesos de ratones.**

|  |  |
| --- | --- |
| **Peso del ratOn(g)** | **Unidades ratOn** |
| 10 | 0,50 |
| 10,5 | 0,53 |
| 11 | 0,56 |
| 11,5 | 0,59 |
| 12 | 0,62 |
| 12,5 | 0,65 |
| 13 | 0,675 |
| 13,5 | 0,70 |
| 14 | 0,73 |
| 14,5 | 0,76 |
| 15 | 0,785 |
| 15,5 | 0,81 |
| 16 | 0,84 |
| 16,5 | 0,86 |
| 17 | 0,88 |
| 17,5 | 0,905 |
| 18 | 0,93 |
| 18,5 | 0,95 |
| 19 | 0,97 |
| 19,5 | 0,985 |
| 20 | 1,000 |
| 20,5 | 1,015 |
| 21 | 1,03 |
| 21,5 | 1,04 |
| 22 | 1,05 |
| 22,5 | 1,06 |
| 23 | 1,07 |

**B.3.6.2** Tabla de Sommer's.

Tiempo de muerte: relación unidades ratón para toxina paralizante de moluscos. (ácida)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Tiempo de Muerte\*** | **Unidades RatOn** | **Tiempo de Muerte** | **Unidades RatOn** |
| 1:00 | 100 | 5:00 | 1,92 |
| 10 | 66,2 | 05 | 1,89 |
| 15 | 38,3 | 10 | 1,86 |
| 20 | 26,4 | 15 | 1,83 |
| 25 | 20,7 | 20 | 1,80 |
| 30 | 16,5 | 30 | 1,74 |
| 35 | 13,9 | 40 | 1,69 |
| 40 | 11,9 | 45 | 1,67 |
| 45 | 10,4 | 50 | 1,64 |
| 50 | 9,33 | 6:00 | 1,60 |
| 55 | 8,42 | 15 | 1,54 |
| 2:00 | 7,67 | 30 | 1,48 |
| 05 | 7,04 | 45 | 1,43 |
| 10 | 6,52 | 7:00 | 1,39 |
| 15 | 6,06 | 15 | 1,35 |
| 20 | 5,66 | 30 | 1,31 |
| 25 | 5,32 | 45 | 1,28 |
| 30 | 5,00 | 8:00 | 1,25 |
| 35 | 4,73 | 15 | 1,22 |
| 40 | 4,48 | 30 | 1,20 |
| 45 | 4,26 | 45 | 1,18 |
| 50 | 4,06 | 9:00 | 1,16 |
| 55 | 4,88 | 30 | 1,13 |
| 3:00 | 3,70 | 10:00 | 1,11 |
| 05 | 3,57 | 30 | 1,09 |
| 10 | 3,43 | 11:00 | 1,075 |
| 15 | 3,31 | 30 | 1,06 |
| 20 | 3,19 | 12:00 | 1,05 |
| 25 | 3,08 | 13 | 1,03 |
| 30 | 2,98 | 14 | 1,015 |
| 35 | 2,88 | 15 | 1,000 |
| 40 | 2,79 | 16 | 0,99 |
| 45 | 2,71 | 17 | 0,98 |
| 50 | 2,63 | 18 | 0,972 |
| 55 | 2,56 | 19 | 0,965 |
| 4:00 | 2,50 | 20 | 1,96 |
| 05 | 2,44 | 21 | 0,954 |
| 10 | 2,38 | 22 | 0,948 |
| 15 | 2,32 | 23 | 0,942 |
| 20 | 2,26 | 24 | 0,937 |
| 25 | 2,21 | 25 | 0,934 |
| 30 | 2,16 | 30 | 0,917 |
| 35 | 2,12 | 40 | 0,898 |
| 40 | 2,08 | 60 | 0,875 |
| 45 | 2,04 | 50 | 2,00 |
|  | 1,96 | 55 | 2,22 |

\*Minutos: segundos

**B.3.6.3 Informe de la prueba**

|  |
| --- |
| µg saxitoxina/100g carne de molusco |

**B.4. DETERMINACION DE ACIDO DOMOICO POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS (HPLC)**

**B.4.1** **Principio del método.**

El ácido domoico es extraído del tejido homogenizado por ebullición en HCl 0,1 N durante 5 minutos. La mezcla es enfriada y centrifugada, una alícuota del sobrenadante es diluida, filtrada y analizada por HPLC isocrática y detección ultravioleta a 242 nm.

**B.4.2** **Equipo.**

**B.4.2.1** Sistema de cromatógrafo de líquidos:

**B.4.2.1.1** Sistema de gasificador por Helio, membrana de vacío o ultrasonido.

**B.4.2.1.2** Sistema de bombas capaz de desarrollar un flujo de 0.5 a 1,5 mL/min.

**B.4.2.1.3** Inyector manual o automático, compatible para inyectar 20 uL de muestra.

**B.4.2.1.4** Detector de ultravioleta de longitud de onda variable a 242 nm.

**B.4.2.1.5** Sistema de datos: graficador, integrador o computadora compatible con la salida de voltaje del detector.

**B.4.2.2** Centrífuga capaz de desarrollar 3000 rpm usando tubos de 100 mL.

**B.4.3** **Materiales.**

**B.4.3.1** Columna HPLC de 15 cm de longitud x 4,6 mm de diámetro interno, empacada con octadecilsilanos (C18) de tamaño de partícula de 5 m.

**B.4.3.2** Filtros de membrana para muestras, de 3 cm de diámetro y tamaño de poro de 0,45 m.

**B.4.3.3** Jeringas de vidrio o desechables de 5 mL.

**B.4.3.4** Tubos para centrífuga de 100 mL.

**B.4.3.5** Matraces volumétricos de 50 y 100 mL.

**B.4.4** **Reactivos.**

**B.4.4.1** Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua se entiende agua desionizada.

**B.4.4.2** Agua grado HPLC (H2O)

**B.4.4.3** Acetonitrilo grado HPLC (C2H3N).

**B.4.4.4** Acido fosfórico ( H3PO4)

**B.4.4.5** Solución de HCl 0,1 N

**B.4.5 Fase móvil.**

**B.4.5.1** Adicionar 2 mL de solución acuosa de H3PO4 a 873 mL de agua desionizada. Mezclar y verificar el pH a aproximadamente 2,5. Adicionar 125 mL de acetonitrilo, mezclar y degasificar.

**B.4.5.2** Solución patrón de ácido domoico 1,09 ng/L.

**B.4.5.3** Esta solución está disponible comercialmente. Refrigerar cuando no se use. Llevar a temperatura ambiente antes de su uso.

**B.4.6** **Procedimiento.**

**B.4.6.1** Preparación de las muestras.

**B.4.6.2** Limpiar completamente el exterior del molusco con agua fresca. Abrir por corte los músculos aductores. Enjuagar el interior con agua fresca para eliminar la tierra u otro material extraño. Quitar la carne de la concha separando los músculos aductores y la conexión del tejido en las valvas (charnela). No usar calor o anestésicos antes de abrir la concha, y no cortar o dañar el cuerpo del molusco en este estado.

**B.4.6.3** Colectar aproximadamente de 100-159 g de carne en un plato de vidrio. Tan pronto como sea posible, transferir la carne a un tamiz del No. 10 y dejar drenar por espacio de 5 minutos. Descartar los drenados. Moler en un procesador de alimentos casero hasta obtener una mezcla homogénea.

**B.4.6.4** Pesar exactamente 50 g de la muestra homogenizada en un matraz de 250 mL. Adicionar 50 mL de solución de HCl 0,1 N y agitar completamente. Rápidamente calentar la mezcla a ebullición (en aproximadamente 10 minutos) y continuar el calentamiento vigoroso, con agitación, por exactamente 5 minutos.

**B.4.6.5** Transferir inmediatamente el matraz y su contenido a un baño de hielo y dejar enfriar a temperatura ambiente (aproximadamente 10 minutos).

**B.4.6.6** Llevar la mezcla enfriada a un matraz volumétrico de 100 mL y diluir al volumen con solución de HCl 0,1 N. Mezclar. Transferir una alícuota de 50 mL a un tubo de centrífuga. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos.

**B.4.6.7** Transferir con pipeta volumétrica de 1-5 mL del sobrenadante clarificado a un matraz volumétrico de 50 mL (el volumen transferido depende de la concentración de ácido domoico esperada). Diluir al volumen con agua y mezclar.

**B.4.6.8** Filtrar un alícuota de 1-2 mL del sobrenadante diluido a través del filtro para muestras y colectar en un frasco vial.

**B.4.7** **Acondicionamiento del equipo.**

**B.4.7.1** Fijar los parámetros cromatográficos requeridos en el método de acuerdo con el manual de operación.

**B.4.7.2** Bombear fase móvil a través del sistema del cromatógrafo hasta la obtención de una línea base estable.

**B.4.7.3** Realizar un análisis preeliminar de la solución de ácido domoico y ajustar la concentración del acetonitrilo en la fase móvil a fin de obtener un tiempo de retención aproximado para el ácido domoico de 8 min.

**B.4.8** **Determinación.**

**B.4.8.1** Inyectar varias réplicas 20 L de solución patrón de ácido domoico hasta que la altura o área de los picos de 3 inyecciones consecutivas no varíen en más del 3%.

**B.4.8.2** Inyectar 20 L de las muestras.

**B.4.9** **Expresión de resultados.**

**B.4.9.1** Cálculos.

g Acido domoico/g = (R/R) x (W/W)

donde:

R= Area o altura promedio del pico de la muestra.

R= Area o altura promedio del pico de la solución estándar de ácido domoico.

W= Peso de la muestra inyectada (mg)

W= Peso de la solución estándar de ácido domoico inyectada (ng)

**B.4.10** Informe de la prueba.

|  |
| --- |
| g de ácido domoico/g |

**B.5. DETERMINACION DE HISTAMINA POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC)**

**B.5.1** Principio del método.

Se basa en la hidrólisis ácida de las proteínas dejando libres a los aminoácidos. La histamina es extraída con n-butanol y el extracto es analizado por cromatografía en capa fina comparando con una curva de histamina.

**B.5.2 Equipo.**

**B.5.2.1** Cámara cromatográfica.

**B.5.2.2** Atomizador de 50 mL para cromatografía.

**B.5.3 Materiales**.

**B.5.3.1** Embudos de separación de 125 mL.

**B.5.3.2** Embudo de Buchner.

**B.5.3.3** Matraz Kitazato de 500 mL.

**B.5.3.4** Cromatofolios AL de sílica gel 60 F 254 (para cromatografía en capa fina de 0,2 mm de espesor).

**B.5.3.5** Microjeringa ajustable de 0-200 L.

**B.5.3.6** Material común de laboratorio.

**B.5.4** **Reactivos.**

**B.5.4.1** Todos los reactivos deben ser de grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua se entiende agua destilada.

**B.5.4.2** Diclorhidrato de histamina (C5H11Cl2N3)

**B.5.4.3** n-Butanol (C4H10O)

**B.5.4.4** Acido clorhídrico (HCl)

**B.5.4.5** Hidróxido de calcio (Ca(OH)2)

**B.5.4.6** Etanol (C2H5OH)

**B.5.4.7** Hidróxido de amonio (NH4OH)

**B.5.4.8** Acetona (C3H6O)

**B.5.4.9** Cloruro de sodio (NaCl)

**B.5.4.10** Solución de HCl 1N

**B.5.4.10.1** Medir 479,8 mL de HCl y llevar a 1 L con agua.

**B.5.4.11** Solución de ninhidrina al 1% (1 mg ninhidrina/mL)

**B.5.4.11.1** Pesar 1 g de ninhidrina y disolver en 100 mL de acetona

**B.5.4.12** Solución patrón de histamina de 5 g/L.

**B.5.4.12.1** Mezclar 30,17 mg de diclorhidrato de histamina (equivalente a 10 mg de histamina), 20 mL de n-butanol y 7,0 g de cloruro de sodio con 20 mL de agua destilada. Agitar durante 5 minutos. Adicionar 2,5 g de hidróxido de calcio y agitar durante 2 minutos. Filtrar en embudo Buchner y pasar a un embudo de separación. Dejar reposar y separar la capa de butanol.

**B.5.5** Procedimiento.

**B.5.5.1** Preparación de la curva patrón.

**B.5.5.2** A partir de la solución patrón de histamina preparar las siguientes diluciones de acuerdo con la tabla siguiente:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| No**. de tubo** | **SoluciOn patrOn de histamina (mL)** | **Volumen final de n-butanol** | **g histamina/L.** |
| 1 | 2,20 | 0,0 | 5,0 |
| 2 | 2,52 | 2,8 | 4,5 |
| 3 | 2,88 | 3,6 | 4,0 |
| 4 | 3,29 | 4,7 | 3,5 |
| 5 | 3,35 | 6,7 | 2,5 |
| 6 | 4,00 | 10,0 | 2,0 |
| 7 | 5,61 | 18,7 | 1,5 |
| 8 | 6,66 | 33,3 | 1,0 |
| 9 | 10,00 | 100,0 | 0,5 |

**B.5.5.3** Agitar y dejar reposar para permitir la separación.

**B.5.6** **Preparación de la muestra.**

**B.5.6.1** Mezclar 50 g de muestra molida en 100 ml de ácido clorhídrico 1 N por 5 minutos.

**B.5.6.2** Filtrar por succión a través de un embudo Buchner con papel filtro grueso.

**B.5.6.3** Tomar una alícuota de 20 mL (4 mL del extracto + 16 mL de agua). Adicionar 20 mL de n-butanol. Agregar 7 g de NaCl y agitar durante 5 minutos.

**B.5.6.4** Agregar 2,5 g de Ca(OH)2. Agitar durante 2 minutos. Filtrar por succión a través de un embudo Buchner con papel filtro grueso.

**B.5.6.5** Separar la capa de butanol.

**B.5.6.6** Determinación.

**B.5.6.7** Tomar alícuotas de 10 L de cada una de las soluciones de la curva patrón y muestras y colocarlas en una placa de sílica gel.

**B.5.6.8** Desarrollo de la TLC.

**B.5.6.9** Poner una mezcla de etanol: hidróxido de amonio: agua (90:6:10) en la cámara para cromatografía y dejar saturar.

**B.5.6.10** Meter la placa y dejar eluir hasta que el frente del solvente haya alcanzado los 5 cm. Sacar de la cámara y dejar secar al aire durante 30 min. Aplicar la solución de ninhidrina al 1% por aspersión y calentar a 100 ºC en estufa durante 2 minutos.

**B.5.7** **Estimación del nivel de histamina.**

**B.5.7.1** Comparar las muestras con las soluciones patrón de histamina en el intervalo de 5-50 mg (25 a 250 mg de histamina).

**B.5.7.2** La cantidad de histamina en la muestra se estima comparando visualmente el desplazamiento de las manchas de la muestra contra el desplazamiento de los patrones de histamina.

**B.5.7.3** Para determinar el contenido de histamina en la muestra es suficiente que una de las manchas de muestra tenga un desplazamiento igual al de por lo menos uno de los patrones.

**B.5.8** **Expresión de resultados.**

**B.5.8.1** Cálculos.

**B.5.8.1.1** Si una de las manchas de las muestras entre 5 y 50 mg equivale al intervalo de 0,5 a 5 g de los patrones, la cantidad de histamina para 50 g de muestra se calcula como sigue:

mg de histamina = 10 E

donde:

E = g de histamina estimados en la muestra entre 0,5 y 5 g

10= L de muestra colocados en la placa.

Si una mancha de la muestra del intervalo de 25 a 250 mg corresponde al intervalo para el patrón de 0,5 a 5 mg, la cantidad de histamina para 50 g de muestra se calcula como sigue:

mg de histamina = 50 E

donde:

E = g de histamina estimados en la muestra entre 0,5 y 5 g

50= L de muestra colocados en la placa.

**B.5.8.1.3** Si el valor obtenido en las muestras analizadas resulta ser mayor de 15 mg/100 g debe analizarse nuevamente haciendo la dilución correspondiente con butanol.

**B.5.9 Informe de la prueba.**

|  |
| --- |
| mg de histamina/kg |

**B.6. DETERMINACION DE SULFITOS EN ALIMENTOS. METODO OPTIMIZADO DE MONIER-WILLIAMS.**

**B.6.1** **Principio del método.**

El método mide sulfitos libres más porciones reproducibles de sulfitos ligados, tales como productos carbonílicos, en alimentos. La muestra es calentada con ácido clorhídrico (HCl) en reflujo para convertir el sulfato a SO2 (sulfitos). El nitrógeno introducido a la solución arrastra el SO2 a través del condensador enfriado por agua y pasa a una solución del H2O2 al 3% donde el SO2 se oxida a ácido sulfúrico (H2SO4). El contenido de sulfito es directamente relacionado al H2SO4 generado, el cual es determinado por titulación con hidróxido de sodio (NaOH) estandarizado. Aplicable para la determinación de 10 ppm de sulfitos en alimentos. Aplicable en presencia de otros compuestos volátiles de azufre, no aplicable a cebollas secas, puerros y calabazas.

**B.6.2 Equipo.**

**B.6.2.1** Aparato de Destilación (nota: En este método la presión dentro del aparato está limitada a la presión propia de la solución de H2 O2 al 3% encima del extremo del burbujeador. Mantener la presión baja para evitar la pérdida del SO2 a través del goteo).

Usar una película delgada de vaselina en las superficies que sellan en todas las juntas, excepto en la junta entre el matraz y el embudo de separación. Poner pinza en cada junta para asegurar que sellen completamente. Ensamblar el aparato según se muestra en la figura siguiente:



**B.6.2.2** Bureta de 10 mL con tubo de sobrellenado y conexiones para tubo Ascarita o el equivalente para permitir mantener una atmósfera libre de CO2 sobre el hidróxido de sodio 0,01N estandarizado.

**B.6.3 Reactivos.**

Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua se entiende agua desionizada.

**B.6.3.1** Acido clorhídrico (HCl) acuoso 4N. Para cada análisis, preparar 90 mL de esta solución mezclando 30 mL de HCl y 60 mL de agua desionizada.

**B.6.3.2** Indicador de rojo de metilo. Disolver 250 mg de rojo de metilo en 100 mL de etanol.

**B.6.3.3** Titulante estandarizado. Hidróxido de sodio (NaOH) 0,010N Estandarizar la solución con estándar de ftalato ácido de potasio.

**B.6.3.4** Solución de peróxido de hidrógeno al 3% (H2 O2).

Para cada análisis, diluir 3 mL de H2 O2 al 30% con 30 mL de agua desionizada. Justo antes de usarse, agregar 3 gotas de indicador de rojo de metilo y titular con hidróxido de sodio (NaOH) 0,010N a un punto final amarillo, si el punto final excedió, descartar la solución.

**B.6.3.5** Nitrógeno de alta pureza. Usar un regulador para mantener el flujo de 200 mL/min. Para evitar oxígeno en el nitrógeno se usa una trampa tipo cromatografía de gases.

**B.6.4 Preparación de la muestra.**

**a)** Sólidos. Transferir 50g de alimento o la cantidad que contenga de 500 a 1500 g de SO2, a un procesador de alimentos o licuadora. Agregar 100 mL de etanol-agua (5+95 v/v) y mezclar. Licuar sólo hasta que el alimento pueda pasar por la junta 24/40 del matraz.

**b)** Líquidos. Mezclar 50g de muestra, o la cantidad que contenga de 500 a 1500 g de SO2 con 100 mL de la mezcla etanol-agua.

**Nota:** Llevar a cabo la preparación de la muestra y el análisis tan rápido como sea posible para evitar la pérdida de formas lábiles de sulfito.

**B.6.5 Preparación del sistema.**

**B.6.5.1** Usando el aparato ensamblado y el matraz puesto en la manta de calentamiento, agregar 400 mL de agua al matraz. Cerrar la llave del embudo de separación y agregar 90 mL de HCl 4N. Empezar con el flujo de nitrógeno. Iniciar el flujo en el refrigerante. Colocar el recipiente con 30 mL de H2O2, el cual ha sido titulado a punto final amarillo con NaOH 0,010N. Después de 15 min, el aparato y el agua estarán completamente desoxigenadas y la porción de muestras debe ser introducida al sistema.

**B.6.5.2** Remover el embudo de separación y cuantitativamente transferir la muestra al matraz. Limpiar la junta y rápidamente aplicar grasa de silicón y regresarlo a su lugar.

**B.6.5.3** El flujo de nitrógeno a través de la solución de H2O2 al 3% se reanuda tan pronto como se coloca el embudo en la junta del matraz. Examinar cada junta para asegurar que esté sellado. Usar un bulbo con válvula para aplicar presión sobre el HCl. Abrir la llave y dejar pasar el HCl al matraz. Continuar sosteniendo la válvula para mantener la suficiente presión sobre la solución de ácido para forzarla a pasar. Cerrar la llave antes de que los últimos 2-3 mL drenen para evitar que el SO2 escape hacia el embudo de separación.

**B.6.5.4** Calentar la manta al calentamiento y regular para calentar lo suficiente, obteniendo de 80 a 90 gotas/min del condensador.

**B.6.5.5** Dejar 1 h 45 min y remover el vaso.

**B.6.6** **Determinación.**

Inmediatamente titular el contenido del vaso o probeta con hidróxido de sodio 0,010N a punto final amarillo y que persista 20 segundos.

**B.6.7** **Expresión de resultados**.

**B.6.7.1** Cálculos.

Calcular el contenido de sulfitos, como sigue:

g SO2,/g= 32,03 x VB x N x 1000

peso de muestra

**donde:**

32,03 = peso milequivalente del SO2

VB = Volumen (Ml) del NaOH

N = Normalidad del NaOH

1000 = Factor para convertir milequivalentes a microequivalentes

Peso de muestra: cantidad de muestra que se introdujo al matraz

**B.7. DETERMINACION DE SULFITOS POR GRAVIMETRIA (OPCIONAL).**

**B.7.1** Después de la titulación, llevar el contenido del recipiente a un vaso de 400 mL agregar 4 gotas de HCl 1N y un exceso de solución de BaCl2 al 10% y dejar reposar toda la noche.

**B.7.2** Lavar el precipitado por decantación 3 veces con agua caliente a través de un Gooch previamente pesado. Lavar con 20 mL de alcohol etílico y 20 mL de éter. Secar a 105° - 110°C.

**B.7.3** Determinar el blanco de reactivos para la titulación y para el método gravimétrico y considerarlo en el cálculo de los resultados.

**B.7.4 Preparación del Aparato de Filtración**

**B.7.4.1** Unir el receptáculo con un filtro de fibra de vidrio.

**B.7.4.2** Colocar lo anterior en el matraz kitasato.

**B.7.4.3** Lavar el filtro con 10 mL de agua caliente, desionizada y después con 10 mL de etanol usando vacío.

**B.7.4.4** Quitar el filtro y secarlo a 110°C durante 12 horas o más. Transferir a desecador para enfriar a temperatura ambiente. Pesar (Wb).

**B.7.4.5** Colocar el filtro en el receptáculo de vidrio.

**B.7.5** **Precipitado de BaSO4**

**B.7.5.1** Pasar el precipitado por el filtro. Lavar con agua para asegurar que todo ha sido filtrado.

**B.7.5.2** Pasar 10 mL de etanol a través del precipitado y filtrar con vacío.

**B.7.5.3** Remover el filtro y secar en estufa a 110°C durante toda la noche.

**B.7.5.4** Transferir a desecador, enfriar y pesar (Wp).

**B.7.6** **Expresión de resultados.**

**B.7.6.1** Cálculos.

Calcular el contenido de sulfitos como sigue:

g SO2,/g= (Wp – Wb) x 274,46

g muestra

Donde:

Wp = Peso de papel filtro con el precipitado de BaSO4 a peso constante

Wb = Peso de papel filtro preparado y puesto a peso constante

**B.7.7** **Ensayos de Recuperación.**

**B.7.7.1** Para familiarizarse y eficientizar el método antes de realizar la rutina, analizar porciones de muestra que contengan cantidades conocidas de sulfitos.

**B.7.7.2** Realizar los análisis de manera que se omita cualquier pérdida de sulfitos por oxidación o reacción con los componentes en el alimento.

**B.7.7.3** Debido a que los sulfitos son reactivos con el aire y con algunas matrices alimenticias y dado que carecen de estabilidad, se debe fortificar con fuentes estables de sulfitos, no sulfito de sodio o sales similares.

**B.7.7.4** El hidroximetil sulfonato de sodio (HMS), el cual es estructuralmente similar a algunas formas combinadas de sulfitos en alimentos, es útil para preparar porciones de prueba fortificada.

**B.7.7.5** Para el análisis, transferir 50g de muestra de alimento libre de sulfitos al matraz. Agregar una alícuota de solución de la sal sódica de hidroximetil sulfonato. Analizar inmediatamente.

**B.7.7.6** Recuperaciones de 80% del HMS con matrices alimenticias de 10 ppm son recomendables para asegurar una adecuada exactitud analítica.

**B.7.8 Informe de las pruebas.**

|  |
| --- |
| g SO2,/g |

**B.8. DETERMINACION DE pH.**

**B.8.1** **Fundamento.**

Es la medida de la diferencia de potenciales entre un electrodo de vidrio y otro de referencia que se genera en una muestra, medido con un potenciómetro. La fuerza electromotriz producida por el sistema de electrodos es proporcional al pH de la muestra problema.

**B.8.2** **Materiales y Equipo.**

**B.8.2.1** Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg.

**B.8.2.2** Molino mecánico para carnes con placa perforada con agujeros de un diámetro no mayor de 4mm.

**B.8.2.3** Potenciómetro graduado en unidades de pH de 0,1 o menos y que permita efectuar lecturas con una exactitud entre 0,05 unidades y provista de un sistema de corrección de temperaturas (en caso de no tenerlo, las lecturas deben tomarse en un rango de temperaturas de 20±2°C).

**B.8.2.4** Electrodos de referencia.

**B.8.2.5** Electrodo de vidrio o sistema de electrodo combinado.

**B.8.2.6** Material común de laboratorio.

**B.8.2.7** Algodón.

**B.8.3** **Reactivos.**

Todos los reactivos deben ser de grado analítico y cuando se mencione agua debe ser destilada.

**B.8.3.1** Etanol al 95% (v/v) C2H6O

**B.8.3.2** Eter etílico saturado con agua C4H10O

**B.8.3.3** Soluciones patrón.

**B.8.3.4** Para calibrar el potenciómetro se pueden usar las siguientes soluciones de referencia:

**B.8.3.4.1** Soluciones patrón con pH 4,0 a 20°C.

**B.8.3.4.2** Pesar con exactitud 10,211g de potasio hidrógeno ftalato (KHC6H4 (COO) 2) previamente secado a 125°C hasta peso constante, disolver en agua y llevar al volumen de 1000 ml.

**B.8.3.4.3** El pH de esta solución a 10°C es de 4,01.

**B.8.3.4.4** Solución patrón con pH 5,45 a 20°C.

**B.8.3.4.5** Mezclar 500 ml de solución 0,2N de ácido cítrico (C6H8O7) en agua con 375 ml de solución de hidróxido de sodio (NaOH) en agua. El pH de esta solución a 10°C es de 5,42 y a 30°C es de 5,48.

**B.8.3.4.6** Solución patrón con pH 6,88 a 20°C.

**B.8.3.4.7** Pesar con exactitud 3,402g de potasio dihidrógeno ortofostato (KH2PO4) y 3,549g de disodio hidrógeno ortofosfato (Na2HPO4), disolver en agua y llevar al volumen a 1 l.

**B.8.3.4.8** El pH de esta solución es 6,92 a 10°C y 6,85 a 30°C.

**B.8.3.4.9** En el caso de disponer de producto comercial seguir las indicaciones del fabricante.

**B.8.4** **Procedimiento:**

Se describen dos procedimientos:

**B.8.4.1** Para productos que pueden ser homogeneizados.

**B.8.4.2** Para productos que no pueden ser homogeneizados.

**B.8.4.3** Preparación de la muestra.

**B.8.4.3.1** Homogeneizar la muestra y pasarla dos veces a través de un molino y después mezclarla perfectamente.

**B.8.4.3.2** En el caso de muestras muy secas para poder homegeneizarlas adicionar una cantidad de agua igual a la masa de muestra tomada para la determinación y mezclarlas perfectamente.

**B.8.4.3.3** Tomar una cantidad de muestra suficiente para que los electrodos puedan sumergirse.

**B.8.4.4** Calibración del potenciómetro.

**B.8.4.5** Calibrar el potenciómetro y usar solución patrón de un pH conocido exactamente y lo más cerca posible del pH que se va a determinar.

**B.8.4.6** Si el procedimiento no tiene un sistema de corrección de temperatura, la temperatura de la solución patrón debe estar dentro del rango de 20±2°C.

**B.8.5** **Medición.**

**B.8.5.1** Introducir los electrodos en la muestra y fijar el sistema de corrección de temperatura a la temperatura de la muestra, en caso de que no lo tenga, la temperatura de la muestra debe estar dentro del rango de 20±2°C.

**B.8.5.2** Efectuar la medición usando el procedimiento descrito en el manual del aparato.

**B.8.5.3** Leer el pH directamente en la escala del instrumento, hasta alcanzar un valor estable.

**B.8.5.4** Llevar a cabo 3 lecturas de la misma muestra.

**B.8.6** **Limpieza de los electrodos.**

Limpiar los electrodos con trozos de algodón mojados con éter etílico y etanol sucesivamente, finalmente lavarlos con agua y guardarlos de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

**B.8.7** **Expresión de los resultados.**

Tomar como resultado la media aritmética de los valores de las tres lecturas siempre y cuando la diferencia entre los valores extremos resultantes no sea mayor de 0,15 unidades de pH.

**B.8.8** **Procedimiento para productos que no puedan homogeneizarse.**

**B.8.8.1** Tomar una porción de muestra suficiente que permita tomar medidas de pH en varios puntos de la misma.

**B.8.8.2** Medición.

Si la muestra tiene consistencia firme, hacer un agujero para cada determinación de manera que el electrodo pueda ser introducido cuidadosamente para no quebrarlo.

**B.8.8.3** Efectuar las lecturas como se describió anteriormente.

Si se considera importante conocer las diferencias entre los valores del pH tomados en diferentes puntos de la muestra, el número de determinaciones estará en función de la naturaleza y el tamaño de la muestra.

El lavado de los electrodos debe hacerse como se describió en el punto 11.10.6

**B.8.8.4** Expresión de resultados.

Tomar como resultado la media aritmética de los valores obtenidos en el mismo punto de la muestra siempre y cuando la variación no sea mayor a 0,15 unidades de pH.

Reportar que el promedio de pH para cada punto al más cercano a 0,1 unidades de pH.

**B.8.9** Precauciones.

Determinar el pH de la muestra inmediatamente cuando sea posible o almacenarla de tal manera que el cambio de pH se restrinja al mínimo.

Durante las mediciones el aparato debe estar protegido de cambios de corriente eléctrica externa.

**B.9. NITROGENO AMONIACAL (NVT).**

**B.9.1** **Fundamento.**

La muestra se destila bajo condiciones establecidas en presencia de óxido de magnesio recibiendo las bases volátiles en un ácido débil de donde son tituladas.

**B.9.2** **Material y equipo.**

**B.9.2.1** Bureta de 10 ml graduada en 0,01

**B.9.2.2** Matraz de Kjeldahl de 800ml

**B.9.2.3** Matraz Erlenmeyer de 500ml

**B.9.2.4** Probeta

**B.9.2.5** Cuerpos de ebullición

**B.9.2.6** Equipo de destilación macro Kjeldahl

**B.9.2.7** Balanza analítica con sensibilidad de 0,1mg

**B.9.2.8** Agua destilada

**B.9.3** **Reactivos.**

**B.9.3.1** Acido bórico H3BO3 al 2% grado reactivo, pesar 20g y diluir con agua destilada a 1 litro.

**B.9.3.2** Acido sulfúrico o clorhídrico 0,1N valorado

**B.9.3.3** Rojo de metilo

**B.9.3.4** Azul de metileno

**B.9.3.5** Etanol

**B.9.3.6** Oxido de magnesio grado reactivo

**B.9.3.7** Antiespumante preparación de silicones o alcohol octílico.

**B.9.3.8** Preparación del reactivo de Wesslow.

**B.9.3.8.1** En una mezcla 60:40 de etanol-agua, agregar rojo de metilo hasta llegar al 0,2%.

**B.9.3.8.2** Preparar una dilución de azul de metileno al 0,2% en agua destilada.

**B.9.3.8.3** Mezclar dos partes de la solución de rojo de metilo con una parte de azul de metileno.

**B.9.4** **Preparación de la muestra.**

**B.9.4.1** Para prevenir la pérdida de agua durante la preparación y subsecuente manejo no se deben usar muestras pequeñas (la cantidad mínima aceptable es de 500g).

**B.9.4.2** Guardar el material molido en recipientes de vidrio o similares con tapas herméticas que lo protejan del aire y del agua.

**B.9.4.3** Pasar la muestra rápidamente tres veces a través de un molino de alimentos con placas de aproximadamente 3mm de abertura.

**B.9.4.4** Mezclar perfectamente después de cada molienda y comenzar todas las determinaciones lo más rápido posible, si ocurriera cualquier demora, congelar la muestra para inhibir la descomposición (-2 a -4°C).

**B.9.5 Procedimiento.**

**B.9.5.1** Pesar 10g de muestra preparada como se indica en el punto 2.4 transferirla cuantitativamente a un matraz de Kjeldahl 800ml.

**B.9.5.2** Agregar 2g de óxido de magnesio, 300 ml de agua destilada y los cuerpos de ebullición (en caso necesario, agregar algún agente antiespumante).

**B.9.5.3** Disgregar perfectamente la muestra, por medio de movimientos circulares. Recibir el destilado en un matraz Erlenmeyer de 500ml conteniendo 25ml de ácido bórico y unas gotas del indicador de Wesslow (la parte terminal del tubo debe estar dentro del ácido).

**B.9.5.4** Conectar el matraz de Kjeldahl al equipo de destilación y calentar de manera que hierva exactamente durante un periodo de 10 min, mantener la temperatura exactamente durante 25 min.

**B.9.5.6** Lavar el refrigerante con agua destilada y titular con ácido sulfúrico o clorhídrico.

**B.9.5.7** Titular la solución destilada utilizando el ácido clorhídrico o sulfúrico.

**B.9.5.8** Simultáneamente, determinar un blanco.

Nota: Antes de realizar la determinación definir los tiempos y temperaturas con una prueba.

**B.9.6** **Cálculos.**

****

El resultado se expresa en mgN/100g

En donde:

v1 = ml de ácido sulfúrico 0,1N requeridos en la titulación de la muestra.

v2 = ml de ácido sulfúrico 0,1N requeridos en la titulación del blanco.

N = Normalidad del ácido sulfúrico o clorhídrico.

PM = Peso de la muestra.

14 = Miliequivalente de Nitrógeno.

**B.10.** **METODO DE PRUEBA PARA LA DETERMINACION DE CADMIO, ARSENICO, PLOMO, ESTAÑO, COBRE, FIERRO, ZINC Y MERCURIO EN ALIMENTOS, AGUA POTABLE Y AGUA PURIFICADA POR ESPECTROMETRIA DE ABSORCION ATOMICA.**

**B.10.1 Fundamento**

El método de absorción atómica se basa en hacer pasar un haz de luz monocromática de una frecuencia tal que puede ser absorbido por el analito que se encuentra presente en forma de vapor atómico. La medida de la intensidad luminosa antes y después de su paso por el vapor atómico permite determinar el porciento de absorción. La cantidad de absorción aumenta con la concentración de los átomos en el medio absorbente, es decir, la medida de la absorción aumenta con la concentración del elemento en la muestra, ya sea que esté en su condición original o sujeta a pretratamiento.

**B.10.2 Reactivos y materiales**

**B.10.2.1** **Reactivos**

**B.10.2.1.1** Soluciones estándares de referencia certificadas de cada uno de los metales.

**B.10.2.1.2** Agua, debe ser destilada deionizada, con un grado máximo de conductividad de 1 µmho/cm a 25ºC.

**B.10.2.1.3** Acido nítrico (densidad específica 1,41), grado suprapuro.

**B.10.2.1.4** Acido nítrico (densidad específica 1,41), contenido de mercurio muy bajo.

**B.10.2.1.5** Acido perclórico (densidad específica 1,67), grado suprapuro.

**B.10.2.1.6** Acido clorhídrico (densidad específica 1,19), grado suprapuro.

**B.10.2.1.7** Acido sulfúrico (densidad específica 1,84), grado suprapuro.

**B.10.2.1.8** Acido sulfúrico 1 N a partir de la solución grado suprapuro.

**B.10.2.1.9** Acido nítrico 65% v/v grado RA.

**B.10.2.1.10** Peróxido de hidrógeno (densidad específica 1,12).

**B.10.2.1.11** Hidróxido de sodio granalla reactivo RA.

**B.10.2.1.12** Aire comprimido seco y limpio.

**B.10.2.1.13** Gases: acetileno, óxido nitroso, argón y nitrógeno, grado absorción atómica.

Solución de Nitrato de Magnesio hexahidratado al 7% p/v. Disolver 70 g de Mg(NO3)2.6H2O en 1000 ml de HCl 1 N.

**B.10.2.1.14** Acido clorhídrico 1 N. Diluir 8,3 ml de HCl y llevar a 100 ml de agua.

**B.10.2.1.15** Acido nítrico al 50% v/v. Diluir 50 ml de HNO3 al 65% v/v grado suprapuro en 50 ml de agua.

**B.10.2.1.16** Acido clorhídrico 8 M. Diluir 66,0 ml de HCl y llevar a 100 ml con agua.

**B.10.2.1.17** Acido clorhídrico 0,5 N. Diluir 4,15 ml de HCl y llevar a 100 ml con agua.

**B.10.2.1.18** Solución de Yoduro de Potasio al 15% p/v. Disolver 15 g de KI en 100 ml de agua (esta solución debe prepararse en el momento de usarse).

**B.10.2.1.19** Solución de Yoduro de Potasio al 20% p/v. Disolver 20 g de KI en 100 ml de agua (esta solución debe prepararse en el momento de usarse).

**B.10.2.1.20** Solución de Cloruro de Potasio (10 mg/ml de K). Disolver 1,91 g de KCl en agua y diluir a 100 ml con agua.

**B.10.2.1.21** Solución de Nitrato de Magnesio al 50% p/v. Disolver 50 g de Mg(NO3)2.6H2O en 100 ml de agua.

**B.10.2.1.22** Solución de ácido clorhídrico al 1,5% p/v. Diluir 1,5 ml de HCl en 100 ml de agua destilada deionizada.

**B.10.2.1.23** Solución de hidróxido de sodio al 1% p/v. Pesar 1 g de hidróxido de sodio y diluir a 100 ml con agua destilada deionizada.

**B.10.2.1.24** Solución de borohidruro de sodio al 4% p/v en solución de hidróxido de sodio al 1% p/v. Pesar 4 g de borohidruro de sodio en 100 ml de una solución de hidróxido de sodio al 1% p/v. Filtrar al vacío.

**B.10.2.1.25** Solución reductora para mercurio. Mezclar 50 ml de ácido sulfúrico concentrado con aproximadamente 300 ml de agua. Enfriar a temperatura ambiente y disolver 15 g de cloruro de sodio, 15 g de sulfato o cloruro de hidroxilamina y 25 g de cloruro o sulfato estanoso en solución. Diluir a 500 ml.

**B.10.2.1.26** Solución de dilución para mercurio. En un matraz de 1 l, conteniendo de 300 a 500 ml de agua destilada deionizada, agregar 58 ml de ácido nítrico concentrado de muy baja concentración de mercurio y 67 ml de ácido sulfúrico concentrado. Diluir al volumen con agua.

**B.10.2.1.27** Solución de trabajo de As de 1 µg/ml. Diluir 1 ml de la solución patrón de 1000 µg/ml a 1 l con ácido sulfúrico 1N preparada a partir de la solución grado suprapuro. Preparar fresca cada día.

**B.10.2.2** **Materiales**

**B.10.2.2.1** Matraces Kjeldahl de 500 ml y 800 ml.

**B.10.2.2.2** Sistema de reflujo con refrigerante.

**B.10.2.2.3** Crisoles Vycor de 40 a 50 ml de capacidad.

**B.10.2.2.4** Crisoles de platino de 40 a 50 ml de capacidad.

**B.10.2.2.5** Matraces Erlenmeyer de diferentes capacidades.

**B.10.2.2.6** Matraces volumétricos de diferentes capacidades.

**B.10.2.2.7** Matraces redondos de fondo plano de 50 ml.

**B.10.2.2.8** Bombas Parr.

**B.10.2.2.9** Micropipetas o pipetas de Eppendorf de diferentes capacidades.

**B.10.2.2.10** Puntas de plástico para micropipetas.

**B.10.2.2.11** Papel filtro Whatman No. 2.

**B.10.2.2.12** Perlas de ebullición.

**B.10.2.2.13** Varillas de plástico.

**B.10.2.2.14** Tubos de ensayo graduados de propilen o propileno de 15 ml.

**B.10.2.2.15** Recipientes de propilen o propileno.

**B.10.2.2.16** Embudos de filtración de diferentes capacidades.

**B.10.2.2.17** Material común de laboratorio.

**B.10.2.2.18** Todo el material utilizado debe someterse a lavado de acuerdo con las siguientes instrucciones:

o El jabón que se use debe ser de preferencia neutro.

o Enjuagar perfectamente con agua corriente.

o Sumergir el material de vidrio o plástico en un recipiente (de preferencia plástico) que contenga una solución de ácido nítrico grado RA al 30 %.

o Dejarlo tapado y reposando por un lapso de 24 horas.

o Quitar el exceso de ácido nítrico con varios enjuagues (5 o 6 veces) con agua deionizada.

o Dejar escurrir y secar.

o Guardar en cuanto esté seco para evitar contaminación por partículas en el aire.

**B.10.3 Aparatos e instrumentos**

**B.10.3.1** **Aparatos**

**B.10.3.1.1** Lámparas de cátodo hueco o de descarga sin electrodos para determinar arsénico, cadmio, cobre, estaño, fierro, mercurio, plomo y zinc.

**B.10.3.1.2** Fuente de radiofrecuencia en caso de usar lámparas de descarga.

**B.10.3.1.3** Automuestreador y recirculador de agua.

**B.10.3.1.4** Placa de calentamiento con regulador que alcance una temperatura de 400 a 450 ºC.

**B.10.3.1.5** Horno de microondas.

**B.10.3.1.6** Autoclave que alcance 121 ± 5ºC o 15 lb de presión.

**B.10.3.1.7** Centrífuga de laboratorio capaz de mantener 1600 rpm.

**B.10.3.2 Instrumentos**

Los instrumentos que a continuación se indican deben estar calibrados y ajustados antes de su operación.

**B.10.3.2.1** Espectrómetro de absorción atómica equipado con los accesorios para flama, horno de grafito, generador de hidruros o vapor frío, dependiendo del método a seguir.

**B.10.3.2.2** Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg.

**B.10.3.2.3** Mufla capaz de mantener una temperatura de 550 ± 10ºC.

**B.10.3.2.4** Horno de calentamiento (estufa) con intervalo de temperatura de 120 ± 5ºC.

**B.10.4 Preparación de la muestra**

**B.10.4.1** Digestión para la determinación de Cd, Cu, Fe, Pb y Zn.

**B.10.4.1.1** Digestión por vía húmeda.

**B.10.4.1.1.1** Pesar con precisión de ± 0,1 mg, una cantidad apropiada de muestra.

Para la determinación por el método de absorción por flama pesar como máximo 40 g de jugo o bebida, 20 g de alimentos que contengan del 50 al 75% de agua y 10 g de alimentos sólidos o semisólidos. Limite el contenido de grasa o aceite a un máximo de 4 g y el total de materia orgánica a 5 g.

**B.10.4.1.1.2** Añadir 10 ml de ácido nítrico concentrado y dejar reposar toda la noche o iniciar directamente la digestión.

**B.10.4.1.1.3** Usar matraz de Kjeldhal o matraz conectado al sistema de refrigerantes.

**B.10.4.1.1.4** Calentar suavemente.

**B.10.4.1.1.5** Digerir la muestra 3 horas o más tiempo si es necesario (algunas muestras requieren la adición de mayor cantidad de ácido nítrico) hasta la aparición del color traslúcido, si queda ámbar, adicionar peróxido de hidrógeno gota a gota con agitación continua (reacción exotérmica).

**B.10.4.1.1.6** Enfriar.

**B.10.4.1.1.7** Recuperar, filtrar y llevar a un volumen conocido en matraz volumétrico.

**B.10.4.1.1.8** Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

**B.10.4.1.1.9** Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica por flama u horno de grafito).

**B.10.4.1.2** Digestión por vía seca.

**B.10.4.1.2.1** Pesar con precisión de ± 0,1 mg, una cantidad apropiada de muestra.

Para la determinación por el método de absorción por flama pesar como máximo 40 g de jugo o bebida, 20 g de alimentos que contengan del 50 al 75% de agua y 10 g de alimentos sólidos y semisólidos. Limite el contenido de grasa o aceite a un máximo de 4 g y el total de materia orgánica a 5 g.

**B.10.4.1.2.2** Añadir 10 ml de ácido nítrico concentrado y dejar reposar toda la noche o iniciar directamente la digestión. En productos con alta concentración de proteínas adicionar una solución de nitrato de magnesio al 7,0% p/v y mezclar completamente, llevar a sequedad aproximadamente durante 6 horas en estufa a una temperatura de 90 a 95ºC.

**B.10.4.1.2.3** Colocar la muestra en una mufla y elevar la temperatura lentamente de 2 a 4ºC por minuto hasta 350°C. Mantener la temperatura hasta que cesen los humos.

**B.10.4.1.2.4** Elevar gradualmente la temperatura de 500 a 550ºC para evitar que la muestra se incinere y mantener esa temperatura durante 16 horas o toda la noche.

**B.10.4.1.2.5** Apagar la mufla y dejar enfriar.

**B.10.4.1.2.6** Un segundo paso de calcinación puede ser requerido para remover algunos residuos de carbón, mediante el siguiente procedimiento:

Lavar las paredes del crisol con 2 ml de ácido nítrico al 50%. Colocar la muestra en una placa de calentamiento puesta a 120ºC para remover el exceso de ácido. Colocar la muestra en una mufla fría y elevar la temperatura gradualmente de 500 a 550ºC, manteniéndola por el tiempo necesario. Repetir este procedimiento cuantas veces sea necesario hasta que quede libre de carbón remanente.

**B.10.4.1.2.7** Disolver las cenizas completamente en 5 ml de ácido clorhídrico 1N, transferir la muestra disuelta a un tubo de propileno o a un matraz de volumen conocido, enjuagar el crisol con dos alícuotas de 5 ml de ácido clorhídrico 1 N y transferir al mismo tubo o matraz para obtener un volumen de 15 ml en el primero y llevar al aforo en el segundo, tapar y mezclar, si existe presencia de partículas o materia insoluble, filtrar en papel Whatman No. 2, antes de la determinación.

**B.10.4.1.2.8** Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

**B.10.4.1.2.9** Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica: flama u horno de grafito).

**B.10.4.2** Digestión por vía húmeda para la determinación de Sn.

**B.10.4.2.1** Proceder igual que en el punto B.10 .4.1.1.1.

**B.10.4.2.2** No adicionar ácido nítrico si no se lleva cabo la digestión total en el mismo día.

**B.10.4.2.3** Adicionar 30 ml de ácido nítrico concentrado al matraz y calentar suavemente por 15 minutos en campana para iniciar la digestión, evitando una excesiva producción de espuma.

**B.10.4.2.4** Hervir suavemente hasta tener un remanente de 3 a 6 ml o hasta que la muestra empiece a secarse en el fondo. No dejar que la muestra se calcine.

**B.10.4.2.5** Retirar la muestra del calor.

**B.10.4.2.6** Al mismo tiempo correr dos blancos de reactivos.

**B.10.4.2.7** Adicionar 25 ml de ácido clorhídrico concentrado, calentar suavemente durante aproximadamente 15 minutos, hasta que todo el cloro sea liberado. Aumentar la temperatura gradualmente hasta ebullición.

**B.10.4.2.8** Evaporar hasta obtener de 10 a 15 ml, usando un matraz similar con 15 ml de agua como patrón de volumen.

**B.10.4.2.9** Adicionar aproximadamente 40 ml de agua.

**B.10.4.2.10** Agitar y pasar a un matraz de 100 ml y enjuagar con 10 ml de agua.

**B.10.4.2.11** Cuando el ácido clorhídrico está presente en la digestión, las muestras se pueden quedar toda la noche o por más tiempo.

**B.10.4.2.12** Agregar 1 ml de solución de cloruro de potasio en cada matraz.

**B.10.4.2.13** Enfriar a temperatura ambiente.

**B.10.4.2.14** Diluir con agua y agregar más agua para compensar el volumen de grasa en el matraz.

**B.10.4.2.15** Mezclar perfectamente y filtrar de 30 a 50 ml a través de un papel filtro Whatman No. 2 y recoger el filtrado en un recipiente de propileno, polipropileno o polietileno.

**B.10.4.2.16** No filtrar los blancos. Tapar las botellas durante el análisis. Las soluciones son estables por varios meses.

**B.10.4.2.17** Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

**B.10.4.2.18** Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica: flama u horno de grafito).

**B.10.4.3** Digestión por vía húmeda para la determinación de Hg.

**B.10.4.3.1** Sistema de reflujo.

**B.10.4.3.1.1** Pesar con precisión de ± 0,1 mg, la cantidad apropiada de muestra, dependiendo el tipo de ésta, en un matraz de digestión y adicionar perlas de ebullición.

**B.10.4.3.1.2** Conectar el matraz al sistema de reflujo y agregar poco a poco la cantidad necesaria de ácido nítrico concentrado y calentar durante media hora o hasta que no se observen cambios en la digestión.

**B.10.4.3.1.3** Dejar enfriar y agregar una mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico concentrados (1 + 1).

**B.10.4.3.1.4** Calentar y agregar más ácido nítrico gota a gota sobre las paredes del recipiente, hasta que el color obscuro de la solución desaparezca.

**B.10.4.3.1.5** Enfriar.

**B.10.4.3.1.6** Si existe grasa o cera filtrar la solución.

**B.10.4.3.1.7** Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

**B.10.4.3.1.8** Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica de vapor frío).

**B.10.4.3.2** Sistema cerrado.

**B.10.4.3.2.1** Pesar con precisión de ± 0,1 mg, la cantidad apropiada de muestra, dependiendo el tipo de ésta, en el recipiente de digestión.

**B.10.4.3.2.2** Agregar la cantidad necesaria de ácido nítrico concentrado.

**B.10.4.3.2.3** Tapar y sellar perfectamente el recipiente de digestión.

**B.10.4.3.2.4** Si el recipiente de digestión es un matraz Erlenmeyer, colocar éste en una autoclave a 15 lb por 30 minutos. Si se utiliza bomba Parr, calentar en parrilla controlando la temperatura a un máximo de 300ºC por 30 minutos.

**B.10.4.3.2.5** Enfriar a temperatura ambiente.

**B.10.4.3.2.6** En caso de que la digestión no sea completa adicionar peróxido de hidrógeno y repetir la digestión.

**B.10.4.3.2.7** Filtrar en caso de que exista grasa o cera y analizar el contenido de Hg.

**B.10.4.3.2.8** Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

**B.10.4.3.2.9** Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica de vapor frío).

**B.10.4.4** Digestión para la determinación de As.

**B.10.4.4.1** Digestión por vía húmeda-seca.

**B.10.4.4.1.1** Proceder como en el punto B.10.4.3.2 hasta que la digestión sea completa y posteriormente continuar con los siguientes pasos.

**B.10.4.4.1.2** Con una pipeta tomar una alícuota de la solución de muestra digerida y colocarla en un crisol Vycor o vaso de precipitados.

**B.10.4.4.1.3** Añadir 1 ml de solución de nitrato de magnesio al 7% p/v y calentar en una parrilla a temperatura baja, hasta sequedad.

**B.10.4.4.1.4** Incrementar el calor de la placa a un máximo de 375ºC.

**B.10.4.4.1.5** Colocar el matraz en la mufla a 450ºC para oxidar cualquier residuo de carbón y descomponer el exceso de nitrato de magnesio, por un tiempo mayor o igual a 30 minutos.

**B.10.4.4.1.6** Enfriar y disolver el residuo en 2,0 ml de ácido clorhídrico 8 M.

**B.10.4.4.1.7** Añadir 0,1 ml de yoduro de potasio al 20% p/v para reducir el As(V) a As(III).

**B.10.4.4.1.8** Dejar reposar por un tiempo mayor a 2 minutos y transferir a un matraz y llevar al aforo con agua.

**B.10.4.4.1.9** Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

**B.10.4.4.1.10** Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica con adaptación para horno de grafito o generador de hidruros).

**B.10.4.4.2** Digestión por vía seca.

**B.10.4.4.2**.**1** Pesar con precisión de ± 0,1 mg, la cantidad necesaria de muestra en un crisol Vycor o de platino.

**B.10.4.4.2.2** Añadir el volumen necesario de nitrato de magnesio al 50% p/v.

**B.10.4.4.2.3** Homogeneizar con una varilla limpia de plástico extendiendo la mezcla en el crisol.

**B.10.4.4.2.4** Colocar la muestra en una mufla subiendo gradualmente la temperatura hasta 300ºC por 2 horas. Posteriormente subir gradualmente la temperatura hasta 500ºC por 16 horas o durante toda la noche.

**B.10.4.4.2.5** Enfriar a temperatura ambiente y humedecer las cenizas con ácido nítrico al 50% v/v.

**B.10.4.4.2.6** Calentar en parrilla hasta la eliminación del ácido.

**B.10.4.4.2.7** Llevar los crisoles a una mufla elevando gradualmente la temperatura de 23 a 500ºC, manteniendo ésta 30 min hasta evaporación total.

**B.10.4.4.2.8** Transferir las cenizas del crisol a un matraz aforado usando una porción de 10 ml de ácido clorhídrico 0,5 N.

**B.10.4.4.2.9** Enjuagar los crisoles con 5 ml de agua destilada y transferir al matraz, añadir 1 ml de solución de yoduro de potasio al 15% y mezclar.

**B.10.4.4.2.10** Dejar reposar durante 15 minutos y llevar al aforo.

**B.10.4.4.2.11** Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

**B.10.4.4.2.12** Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica con adaptación para horno de grafito o generador de hidruros).

**B.10.4.5** Digestión para la determinación de Cd, As, Pb, Sn, Cu, Fe, Zn y Hg por horno de microondas.

Pesar con precisión de ± 0,1 mg, 0,500 g como máximo de muestra, añadir 6 ml de ácido nítrico concentrado y 2 ml de agua oxigenada al 30%, cerrar perfectamente el envase de reacción y proceder según el manual del fabricante.

**B.10.5 Procedimiento**

**B.10.5.1** Espectrometría de absorción atómica por flama.

**B.10.5.1.1** Calibración. Es necesario comprobar que se tiene una calibración inicial y periódica aceptable.

**B.10.5.1.1.1** Se inicia la configuración operacional del instrumento y en el sistema de adquisición de datos. Permitir un periodo no menor a 30 minutos para el calentamiento de las lámparas de descarga sin electrodos.

**B.10.5.1.1.2** Se debe verificar la estabilidad del instrumento mediante el análisis de una solución estándar 20 veces más concentrada que el límite de detección del instrumento (LDI) para el analito, leída un mínimo de cinco veces y calculando la desviación estándar resultante, la cual debe ser menor al 5%.

**B.10.5.1.1.3** El instrumento debe calibrarse para el analito a determinar usando el blanco de calibración y los estándares de calibración preparados a 3 o 4 niveles de concentración dentro del intervalo dinámico de concentración del analito.

**B.10.5.1.1.4** Ajustar el instrumento a 0 con el blanco de calibración. Introducir los estándares de calibración del analito de menor a mayor concentración y registrar al menos tres réplicas de la absorbancia de cada uno.

**B.10.5.1.1.5** Elaborar una curva de calibración graficando absorbancia en función de la concentración.

Lo anterior puede llevarse a cabo en equipos que se programan directamente, en los cuales sólo es necesario introducir los estándares y marcar su concentración teórica.

**B.10.5.1.2** Operación del instrumento.

El desempeño del instrumento se verifica mediante el empleo de blancos de calibración, estándares de calibración y una muestra de control de calidad (MCC).

**B.10.5.1.2.1** Después de que se ha realizado la calibración, se debe verificar que el instrumento trabaje adecuadamente para el analito. Para ello se analiza una muestra de control de calidad. Si las mediciones varían en ± 10% o más, al valor establecido para la MCC, el análisis debe interrumpirse y buscar la posible causa de error, el instrumento se debe recalibrar y verificar la nueva calibración.

**B.10.5.1.2.2** Para verificar que el instrumento no presenta deriva, por cada 10 análisis se debe analizar el blanco de calibración. Si el valor verdadero del analito difiere ± 10% o más, el instrumento debe recalibrarse. Si el error persiste debe identificarse el problema y corregirse.

Si la matriz de la muestra es responsable de la deriva o afecta la respuesta del analito puede ser necesario trabajar por adiciones estándar.

**B.10.5.1.2.3** La demostración de la operatividad inicial del instrumento se hace estableciendo los límites de detección del método (LDM) para el analito y el intervalo de calibración lineal. Para determinar el LDM se usa un blanco de reactivos fortificado con una concentración del analito equivalente de 2 a 5 veces el límite de detección estimado. Se hacen al menos 4 réplicas de lectura de absorbancia del blanco de reactivos fortificado procesado a través de todo el método analítico. Los LDM se calculan de acuerdo a:

LDM= t x s

t = valor de la "T" de Student a un intervalo de confianza de 99% y una desviación estándar estimada para n-1 grados de libertad. t = 3,14 para 7 réplicas.

s = desviación estándar de las réplicas del análisis.

El intervalo lineal de calibración se establece a partir de por lo menos 4 estándares de diferente concentración, uno de los cuales debe estar próximo al límite superior del intervalo lineal.

**B.10.5.1.3** Determinación

**B.10.5.1.3.1** Ajustar el instrumento de absorción atómica en las condiciones adecuadas para la determinación del analito de acuerdo a las indicaciones del manual del instrumento.

**B.10.5.1.3.2** Introducir el blanco de reactivos y la muestra a analizar y registrar los valores de absorbancia. Se debe analizar al menos un blanco de reactivos con cada grupo de muestras. Los valores obtenidos ponen de manifiesto la calidad de los reactivos usados y el grado de contaminación del laboratorio.

**B.10.5.1.3.3** En los equipos que pueden programarse, la lectura obtenida da directamente la concentración del elemento en las unidades de concentración utilizadas.

**B.10.5.1.3.4** Se debe analizar al menos un blanco de reactivos fortificado para cada grupo de muestras. Se calcula la exactitud como el porciento de recuperación (de acuerdo al apartado B.10.5.1.3.6).

**B.10.5.1.3.5** Se debe fortificar al menos una muestra por grupo o el 10% de ellas lo que resulte mayor. La concentración añadida debe ser de aproximadamente 0,1 unidades de absorbancia.

**B.10.5.1.3.6** Se debe calcular el porciento de recuperación para el analito, de acuerdo a:

CM - C

R = -------------- x 100

CA

R = % recuperación

CM = Concentración de la muestra fortificada

C = Concentración de la muestra

CA = Concentración equivalente de analito añadido a la muestra.

Si la recuperación del analito en la muestra fortificada está fuera del intervalo previamente establecido y el blanco de reactivos fortificado está correcto, puede existir un problema relacionado con la matriz de la muestra. Los datos se deben verificar por el método de las adiciones estándar.

**B.10.5.2** Espectrometría de absorción atómica por horno de grafito.

**B.10.5.2.1** Calibración.

**B.10.5.2.1.1** Proceder de acuerdo a los puntos B.10.5.1.1.1 a B.10.5.1.1.4

**B.10.5.2.1.2** Elaborar una curva de calibración graficando área de pico o altura máxima contra concentración del analito.

La calibración mediante el uso de una computadora o una calculadora basada en el ajuste sobre los datos de concentración respuesta es aceptada.

Lo anterior puede llevarse a cabo en equipos que se programan directamente, en los cuales sólo es necesario introducir los estándares y marcar su concentración teórica.

**B.10.5.2.2** Operación del instrumento.

**B.10.5.2.2.1** Proceder de acuerdo a B.10.5.1.2.1 a B.10.5.1.2.3

**B.10.5.2.3** Determinación.

**B.10.5.2.3.1** Ajustar el instrumento de absorción atómica en las condiciones adecuadas para la determinación del analito, de acuerdo a las recomendaciones del manual del instrumento.

El programa de temperaturas para el horno de grafito puede variar dependiendo de la matriz de la muestra. En el caso de existir interferencias no específicas (absorción molecular o dispersión de la luz), se recomienda consultar la bibliografía existente en cuanto a los métodos disponibles para eliminarlas, así como en el caso de interferencias de matriz.

**B.10.5.3** Espectrometría de absorción atómica por generador de hidruros.

**B.10.5.3.1** Calibración.

**B.10.5.3.1.1** Proceder de acuerdo a los puntos B.10.5.1.1.1 a B.10.5.1.1.4

**B.10.5.3.1.2** A partir de la solución estándar de As de 1000 mg/l, preparar una solución de As de 1 mg/l en ácido clorhídrico de concentración apropiada al método. Trazar una curva de calibración de absorbancia (máximo de la altura de pico) en función de la concentración del analito para un intervalo de concentración de 0 a 10 µg/l de As bajo las mismas condiciones de la matriz de la muestra.

**B.10.5.3.2** Operación del instrumento.

**B.10.5.3.2.1** Proceder de acuerdo a los puntos B.10.5.1.2.1 a B.10.5.1.2.3

**B.10.5.3.3** Determinación.

**B.10.5.3.3.1** Ajustar el instrumento de absorción atómica en las condiciones adecuadas para la determinación de As: longitud de onda de 193,7 nm y lámpara de descarga sin electrodos. Colocar y ajustar la celda de absorción de acuerdo al manual del fabricante. Ajustar el flujo de gas (nitrógeno o argón).

**B.10.5.3.3.2** Ajustar a 0 de absorbancia con el blanco de calibración de ácido clorhídrico al 1,5% siguiendo las instrucciones del manual del fabricante.

**B.10.5.3.3.3** Optimizar con un estándar de calibración la respuesta del instrumento al analito (por lo general, 10 ml de una solución de 5 µg/l de As da una absorbancia de 0,2), ajustando el tiempo de purga I, el tiempo de reacción y el tiempo de purga II.

**B.10.5.3.3.4** Tomar un volumen conocido de la muestra dirigida y seguir el mismo procedimiento que con los estándares de calibración.

**B.10.5.4** Espectrometría de absorción atómica por vapor frío.

**B.10.5.4.1** Calibración.

**B.10.5.4.1.1** Proceder igual que en los puntos B.10.5.1.1.1 a B.10.5.1.1.4.

**B.10.5.4.1.2** A partir de la solución de trabajo de 1 µg/ml preparar estándares de calibración que contengan 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1,0 µg de Hg a frascos de reacción. A cada frasco agregar 100 ml de la solución de dilución y 20 ml de la solución de reducción. Trazar la curva de calibración de absorbancia (altura máxima de pico) en función de la concentración del analito.

**B.10.5.4.2** Operación del instrumento.

**B.10.5.4.2.1** Proceder de acuerdo a los puntos B.10.5.1.2.1 a B.10.5.1.2.3.

**B.10.5.4.3** Determinación.

**B.10.5.4.3.1** Ajustar el instrumento de absorción atómica en las condiciones adecuadas para la determinación de Hg: longitud de onda de 253,6 nm, slit 0,7 nm y lámpara de cátodo hueco. Colocar y ajustar la celda de absorción de acuerdo al manual del fabricante. Ajustar el flujo de gas (nitrógeno o argón).

**B.10.5.4.3.2** Ajustar a 0 de absorbancia con el blanco de calibración (solución de dilución y de reducción) siguiendo las instrucciones del manual del fabricante.

**B.10.5.4.3.3** Optimizar con un estándar de calibración la respuesta del instrumento al analito.

**B.10.5.4.3.4** Tomar 25 ml de la muestra digerida y seguir el mismo procedimiento que con los estándares de calibración.

**B.10.6 Expresión de resultados**

**B.10.6.1** Método de cálculo.

Interpolar los valores de absorbancia o altura de pico de la muestra analizada en la curva de calibración y obtener los mg/kg del elemento en la muestra y realizar los cálculos empleando la siguiente fórmula:

A x B

mg/ kg = --------

C

en donde:

A = Concentración en mg/kg de la muestra a interpolar en la curva de calibración.

B = Volumen final al que se llevó la muestra (ml).

C = Peso de la muestra (g) o volumen de la muestra (ml) en el caso de agua.

En los equipos que pueden programarse, la lectura obtenida da directamente la concentración del elemento en mg/kg o µg/kg.

**B.10.7 Informe de la prueba**

Los resultados se informarán en mg/kg o µg/kg del elemento a determinar.

**B.11.** **PREPARACION Y DILUCION DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANALISIS MICROBIOLOGICO.**

**B.11.1 Fundamento**

Se basa en la preparación de diluciones primarias, para obtener una distribución lo más uniforme posible de los microorganismos presentes en la porción de muestra.

**B.11.2 Reactivos y materiales**

**B.11.2.1** Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico. Cuando se indique agua debe entenderse como agua destilada.

**B.11.2.1.1** Preparación de reactivos

**B.11.2.1.1.1** Solución de hidróxido de sodio 1,0 N

|  |  |
| --- | --- |
| **FORMULA** | |
| **Ingredientes** | **Cantidades** |
| Hidróxido de sodio | 4,0 g |
| Agua | 100,0 ml |

**Preparación**: Disolver el hidróxido de sodio y llevar a 100 ml con agua.

**B.11.2.1.1.2** Soluciones diluyentes

**B.11.2.1.1.2.1** Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada).

|  |  |
| --- | --- |
| **FORMULA** | |
| **Ingredientes** | **Cantidades** |
| Fosfato de Sodio monobásico | 34,0 g |
| Agua | 1,0 l |

**Preparación**: Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1,0 N. Llevar a un litro con agua. Esterilizar durante 15 minutos a 121° ± 1,0 °C. Conservar en refrigeración (solución concentrada). Tomar 1,25 ml de la solución concentrada y llevar a un litro con agua (solución de trabajo). Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera. Esterilizar a 121° ± 1,0 °C durante 15 minutos. Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales.

**B.11.2.1.1.2.2** Agua peptonada

|  |  |
| --- | --- |
| **FORMULA** | |
| **Ingredientes** | **Cantidades** |
| Peptona | 1,0 g |
| Cloruro de sodio | 8,5 g |
| Agua | 1,0 l |

**Preparación:** Disolver los componentes en un litro de agua. Ajustar el pH a 7 ± O,1 con hidróxido de sodio 1,0 N. Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera. Esterilizar a 121 ± 1,0 °C durante 15 minutos. Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales. Si este diluyente no es usado inmediatamente, almacenar en lugar obscuro a una temperatura entre 0 a 5°C por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición.

**B.11.2.2** **Materiales**

**B.11.2.2.1** Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 ml (o si es necesario de 1 ml y 2 ml), con tapón de algodón. Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.

**B.11.2.2.2** Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.

**B.11.2.2.3** Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca.

**B.11.2.2.4** Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.

**B.11.2.2.5** Todo el material e instrumentos que tengan contacto con las muestras bajo estudio deberán esterilizarse mediante:

Horno, durante 2 h a 170 a 175°C o 1 h a 180 °C o Autoclave, durante 15 minutos como mínimo a 121 ± 1,0 °C.

**B.11.2.2.6** El material de vidrio puede sustituirse por material desechable que cumpla con las especificaciones deseadas. No debe usarse material de vidrio dañado por esterilización repetida y éste debe ser químicamente inerte.

**B.11.3 Aparatos e instrumentos**

**B.11.3.1** Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170°C.

**B.11.3.2** Autoclave con termómetro y manómetro, calibrada con termómetro de máximas y mínimas.

**B.11.3.3** Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de 0,1°C y que mantenga la temperatura a 45 ± 0,5°C.

**B.11.3.4** Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato o bien un homogeneizador peristáltico (Stomacher).

**B.11.3.5** Vasos para licuadora con tapa esterilizables o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico.

**B.11.3.6** Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g.

**B.11.4 Procedimiento**

**B.11.4.1** Preparación de la dilución primaria.

**B.11.4.1.1** A partir de muestras líquidas:

Para muestras líquidas no viscosas (agua, leche, refrescos, etc.) en las cuales la distribución de microorganismos es homogénea o fácilmente homogeneizable por medios mecánicos (agitación, etc.)

Para muestras congeladas de un alimento originalmente líquido o licuable, fundir por completo en baño de agua de 40 a 45°C un tiempo máximo de 15 minutos y homogeneizar agitando vigorosamente.

Para la parte líquida de una muestra heterogénea la cual sea considerada suficientemente representativa de la muestra total (Por ejemplo la fase acuosa de grasas animales y vegetales).

**B.11.4.1.1.1** Agitar la muestra manualmente con 25 movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo de 7 segundos. Tomar 1 ml de la muestra y diluir con 9 ml del diluyente el cual debe encontrarse a una temperatura similar a ésta, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente.

**B.11.4.1.1.2** Siempre que la cantidad de muestra lo permita, tomar alícuotas mayores, por ejemplo volúmenes de 10 u 11 ml, diluídos con 90 o 99 ml, de la misma forma que se describió anteriormente

**B.11.4.1.2** A partir de muestras sólidas o semisólidas.

Las muestras sólidas y semisólidas congeladas, deben descongelarse en refrigeración de 4 a 8°C durante 18 horas y no más de 24 horas antes de proceder a su análisis.

**B.11.4.1.2.1** Pesar una cantidad de 10 u 11 g de la muestra por analizar en un recipiente o bolsa plástica estériles de tamaño adecuado.

**B.11.4.1.2.2** Adicionar un volumen de 90 a 99 ml del diluyente llevado a una temperatura similar a la de la muestra.

**B.11.4.1.2.3** Operar la licuadora o el homogeneizador peristáltico de 1 a 2 minutos hasta obtener una suspensión completa y homogénea según se indique en la técnica correspondiente para cada alimento. Aún en los equipos más lentos, este tiempo no debe exceder de 2,5 minutos.

**B.11.4.1.2.4** Permitir que las partículas grandes se sedimenten, y transferir la cantidad deseada tomando de las capas superiores de la suspensión.

Cuando la dilución primaria es muy viscosa o pegajosa, adicionar más diluyente, lo cual debe tomarse en cuenta para las operaciones subsecuentes o expresión de resultados.

El homogeneizador peristáltico (Stomacher) puede no ser adecuado para algunos productos (por ejemplo, aquellos con partículas agudas o constituyentes que no se dispersen fácilmente). Debe ser utilizado sólo cuando exista evidencia (publicada o por ensayos comparativos) de que los resultados obtenidos no difieren significativamente con aquellos obtenidos con licuadora.

**B.11.4.2** Preparación de las diluciones decimales adicionales.

**B.11.4.2.1** Transferir 1 ml o un múltiplo, por ejemplo, 10 u 11 ml de la dilución primaria 1 + 9 (10-1), en otro recipiente conteniendo nueve veces el volumen del diluyente estéril a la temperatura apropiada, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente.

**B.11.4.2.2** Mezclar cuidadosamente cada botella de diluyente siempre de la misma manera que se describe en B.11.4.1.1.1.

**B.11.4.2.3** La selección de las diluciones que se vayan a preparar y de aquellas que se van a inocular, dependen del número esperado de microorganismos en la muestra, con base a los resultados de análisis previos y de la información que se obtenga del personal de inspección que la haya colectado. En ausencia total de información, trabajar con las diluciones de la primera a la sexta.

**B.11.4.2.4** Utilizar pipetas diferentes para cada dilución inoculando simultáneamente las cajas que se hayan seleccionado. El volumen que se transfiera nunca debe ser menor al 10% de la capacidad total de la pipeta.

**B.11.4.2.5** Si la pipeta es terminal y se transfiere un volumen de líquido equivalente a su capacidad total, escurrir aplicando la punta de la pipeta una sola vez en un área de la caja Petri sin líquido.

**B.11.4.2.6** Mientras se afora el líquido de la pipeta, la punta de ésta debe apoyarse en el interior del cuello del frasco y mantenerla en posición vertical, para lo cual este último debe inclinarse lo necesario.

En estudios donde se busca la presencia o ausencia de una determinada especie de microorganismos en 0,1 ml o 0,1 g, no es necesario preparar diluciones mayores.

El criterio para seleccionar las diluciones a preparar de acuerdo con el número de microorganismos esperado es:

Para la técnica del número más probable utilizar tres tubos: donde sea posible demostrar el microorganismo en 10 ml de la dilución más alta.

Para la técnica de cuenta en placa, considerar aquellas en las que se puedan contar de 25 a 250 colonias en un mínimo de una de tres diluciones en el método de cuenta de bacterias aerobias en placa. En el caso de otros grupos microbianos, considerar el número especificado de colonias en la NOM correspondiente.

**B.11.4.3** Duración del procedimiento.

En general, las diluciones de la muestra deben ser preparadas inmediatamente antes del análisis y éstas deben ser usadas para inocular el medio de cultivo dentro de los 20 minutos posteriores a su preparación.

**B.12. DETERMINACION DE BACTERIAS COLIFORMES. TECNICA DEL NUMERO MAS PROBABLE. (Este Capítulo quedará sin efectos a los 270 días naturales siguientes a la entrada en vigor de la NOM-210-SSA1-2014, Art. Segundo Transitorio de la mencionada NOM publicada el 26/VI/2015).**

**~~B.12.1~~****~~Fundamento~~**

~~El método se basa en que las bacterias coliformes, fermentan la lactosa incubadas a 35 ± 1° C durante 24 a 48 horas, resultando una producción de ácidos y gas el cual se manifiesta en las campanas de fermentación.~~

**~~B.12.2 Reactivos y materiales~~**

~~Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico. Cuando se indique agua debe entenderse como agua destilada con pH cercano a la neutralidad.~~

**~~B.12.2.1~~** ~~Reactivos~~

**~~B.12.2.1.1~~** ~~Soluciones diluyentes~~

**~~B.12.2.1.1.1~~** ~~Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada)~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~FORMULA~~** | |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Fosfato monopotásico~~ | ~~34,0 g~~ |
| ~~Agua~~ | ~~1,0 l~~ |

**~~Preparación~~**~~: Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1N. Llevar a un litro con agua. Esterilizar durante 15 minutos a 121 ± 1,0 °C. Conservar en refrigeración (solución concentrada). Tomar 1,25 ml de la solución concentrada y llevar a un litro con agua. Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera. Esterilizar durante 15 minutos a 121 ± 1 °C. Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.~~

**~~B.12.2.1.1.2.~~** ~~Agua peptonada~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~FORMULA~~** | |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Peptona~~ | ~~1,0 g~~ |
| ~~Cloruro de sodio~~ | ~~8,5 g~~ |
| ~~Agua~~ | ~~1,0 l~~ |

**~~Preparación:~~** ~~Disolver los componentes en un litro de agua. Ajustar el pH a 7,0 con hidróxido de sodio 1 N. Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera. Esterilizar durante 15 minutos a 121 ± 1,0 °C. Después de la esterilización los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales. Si este diluyente no es usado inmediatamente, almacenar en lugar obscuro a una temperatura entre 0 a 5°C por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición.~~

**~~B.12.2.1.2~~** ~~Medios de cultivo.~~

~~Caldo lactosado (medio de enriquecimiento para agua potable y hielo).~~

~~Caldo lauril sulfato triptosa (medio de enriquecimiento selectivo).~~

~~Caldo lactosa bilis verde brillante (medio de confirmación).~~

~~En el caso del análisis de agua potable y hielo puede utilizarse caldo lactosado o caldo lauril sulfato triptosa con púrpura de bromocresol (concentración 0,01 g/l de medio), como alternativa al uso de campanas de fermentación. Los tubos positivos se manifiestan por el vire del indicador a color amarillo.~~

**~~B.12.2.1.2.1~~** ~~Caldo lactosado~~

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **~~Ingrediente~~** | **~~Medio de concentración~~**  **~~1,5~~** | **~~Medio de concentración sencilla~~** |
| ~~Extracto de carne~~ | ~~4,5 g~~ | ~~3,0 g~~ |
| ~~Peptona de gelatina~~ | ~~7,5 g~~ | ~~5,0 g~~ |
| ~~Lactosa~~ | ~~7,5 g~~ | ~~5,0 g~~ |
| ~~Agua destilada~~ | ~~1000,0 ml~~ | ~~1000,0 ml~~ |

~~Disolver los ingredientes en 1 l de agua, calentando si es necesario o el medio completo deshidratado, siguiendo las instrucciones del fabricante. Ajustar el pH final de tal manera que después de la esterilización éste sea de 6,9 ± 0,2 a 25°C. Distribuir en volúmenes de 10 ml en tubos con dimensiones de 16 x 160 mm el medio de concentración sencilla y de 20 ml en tubos de 20 x 200 mm el medio de concentración 1,5, cada tubo debe tener campana de fermentación. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ± 1,0 °C. Enfriar rápidamente para evitar una exposición excesiva al calor. El aspecto del caldo es claro y de color beige. Se puede utilizar una concentración doble del medio de cultivo, en cuyo caso se emplearán 10 ml del caldo preparado, cuando se agreguen 10 ml de la muestra.~~

**~~B.12.2.1.2.2~~** ~~Caldo lauril sulfato triptosa.~~

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **~~Ingrediente~~** | **~~Medio de concentración 1,5~~** | **~~Medio de concentración sencilla~~** |
| ~~Triptosa~~ | ~~30,0 g~~ | ~~20,0 g~~ |
| ~~Lactosa~~ | ~~7,5 g~~ | ~~5,0 g~~ |
| ~~Fosfato dipotásico~~ | ~~4,125 g~~ | ~~2,75 g~~ |
| ~~Fosfato monopotásico~~ | ~~4,125 g~~ | ~~2,75 g~~ |
| ~~Cloruro de sodio~~ | ~~7,50 g~~ | ~~5,0 g~~ |
| ~~Lauril sulfato de sodio~~ | ~~0,15 g~~ | ~~0,1 g~~ |
| ~~Agua destilada~~ | ~~1000,0 ml~~ | ~~1000,0 ml~~ |

~~Disolver los componentes en 1 l de agua, calentando si es necesario o el medio de cultivo completo deshidratado, siguiendo las instrucciones del fabricante. Ajustar el pH de tal manera que después de la esterilización éste sea de 6,8 ± 0,2 a 25°C. Distribuir en volúmenes de 10 ml en tubos con dimensiones de 16 x 160 mm el medio de concentración sencilla y de 20 ml en tubos de 20 x 200 mm el medio de concentración 1,5, cada tubo debe tener campana de fermentación. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ± 1,0°C. Se recomienda almacenar el medio una vez preparado. Las campanas de fermentación no deben de contener burbujas de aire después de la esterilización. Se puede utilizar una concentración doble del medio de cultivo, en cuyo caso se emplearán 10 ml de caldo preparado, cuando se agreguen 10 ml de muestra.~~

**~~B.12.2.1.2.3~~** ~~Lactosa bilis verde brillante~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~FORMULA~~** | |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Peptona~~ | ~~10,0 g~~ |
| ~~Lactosa~~ | ~~10,0 g~~ |
| ~~Sales biliares~~ | ~~20,0 g~~ |
| ~~Verde brillante~~ | ~~0,0133 g~~ |
| ~~Agua~~ | ~~1,0 l~~ |

~~Disolver los componentes o el medio completo deshidratado en agua, calentar si es necesario. Ajustar el pH, de tal manera que después de la esterilización éste sea de 7,2 a 25°C. Distribuir el medio en cantidades de 10 ml en tubos de 16 X 160 mm conteniendo campana de fermentación. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ± 1,0°C. Las campanas de fermentación no deben contener burbujas de aire después de la esterilización.~~

**~~B.12.2.2~~** ~~Materiales~~

~~Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 ml (o si es necesario de 11 y 2 ml), con tapón de algodón. Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.~~

~~Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.~~

~~Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.~~

~~Tubos de cultivo 20 x 200 mm y de 16 x 160 mm con tapones metálicos o de rosca.~~

~~Campanas de fermentación (tubos de Durham).~~

~~Pipetas bacteriológicas graduadas de 10 y 1 ml~~

~~Gradillas.~~

~~Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro~~

~~Todo el material que tenga contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse mediante:~~

~~Horno, durante 2 horas a 170 a 175°C o 1 h a 180°C o autoclave, durante 15 minutos como mínimo a 121 ± 1,0°C.~~

~~El material de vidrio puede sustituirse por material desechable que cumpla con las especificaciones deseadas. No debe usarse material de vidrio dañado por las esterilizaciones repetidas y éste debe ser químicamente inerte.~~

**~~B.12.3 Aparatos e instrumentos~~**

~~Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170 °C.~~

~~Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de ± 1,0°C, provista con termómetro calibrado.~~

~~Termómetro de máximas y mínimas.~~

~~Autoclave que alcance una temperatura mínima de 121 ± 1,0°C.~~

~~Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH a 25°C.~~

**~~B.12.4 Preparación de la muestra~~**

~~Las muestras deben prepararse y diluirse, siempre que sea posible, de acuerdo al Método de Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.~~

**~~B.12.5 Procedimiento~~**

**~~B.12.5.1~~** ~~Para alimentos.~~

~~Preparar suficiente número de diluciones para asegurar que todos los tubos correspondientes a la última dilución rindan un resultado negativo.~~

**~~B.12.5.1.1~~** ~~Prueba presuntiva~~

**~~B.12.5.1.1.1~~** ~~Inoculación. Tomar tres tubos de medio de enriquecimiento de mayor concentración. Usar una pipeta estéril para transferir a cada tubo 10 ml de la muestra si es líquida o 10 ml de la dilución primaria inicial, en el caso de otros productos.~~

**~~B.12.5.1.1.1.1~~** ~~Tomar tres tubos de concentración sencilla del medio selectivo de enriquecimiento. Usar una pipeta estéril para transferir a cada uno de estos tubos 1 ml de la muestra si es líquida o 1 ml de la dilución primaria en el caso de otros productos.~~

**~~B.12.5.1.1.1.2~~** ~~Para las diluciones subsecuentes, continuar como se indica en el párrafo anterior, usando una pipeta diferente para cada dilución. Mezclar suavemente el inóculo con el medio.~~

**~~B.12.5.2.1.2~~** ~~Incubación. Incubar los tubos a 35 ± 0,5 °C por 24 ± 2 horas y observar si hay formación de gas, en caso contrario prolongar la incubación hasta 48 ± 2 horas~~

**~~B.12.5.1.2~~** ~~Prueba confirmativa~~

~~De cada tubo que muestre formación de gas, tomar una asada y sembrar en un número igual de tubos con medio de confirmación. Incubar a 35 ± 0,5 °C por 24 ± 2 horas o si la formación de gas no se observa en este tiempo, prolongar la incubación por 48 ± 2 horas.~~

~~En esta NOM se considera una combinación de tres tubos por cada dilución de la serie. Para algunos productos y siempre que se requiera una mayor precisión en los resultados, será necesario inocular una serie de cinco o diez tubos.~~

**~~B.12.6 EXPRESION DE LOS RESULTADOS.~~**

~~Tomar la serie de tubos de la prueba confirmativa que dé formación de gas después del período de incubación requerido y buscar el NMP en los cuadros correspondientes.~~

~~El cuadro 3 muestra algunos ejemplos que se pueden presentar.~~

~~Ejemplos:~~

~~Ejemplo 1. Cuando sólo una dilución muestra tres tubos positivos, elegir ésta y las diluciones mayores posteriores.~~

~~Ejemplo 2. Cuando más de una dilución muestra tres tubos positivos y la última da menos de tres, elegir esta última y las dos diluciones anteriores más bajas.~~

~~Ejemplo 3. Cuando en ninguna dilución hay tres tubos positivos y éstos se encuentran en más de tres diluciones, seleccionar las dos diluciones mayores positivas y la siguiente.~~

~~Ejemplos 4 y 5. Cuando los tubos positivos sólo se encuentran en la muestra sin diluir (10 ml o 1 g) y en la primera dilución (1 ml o 10~~~~-1~~~~), seleccionar las tres primeras diluciones para el cálculo del número más probable.~~

~~En cada caso se obtiene un número de tres cifras, lo cual es representado en los cuadros 4 al 7, según corresponda. En la columna que indica el número de tubos positivos se busca el índice del NMP.~~

~~La técnica de NMP puede admitir gran cantidad de variaciones. Los resultados obtenidos con esta técnica deben ser utilizados con precaución. Los límites de confianza están representados en los cuadros 4 al 7. Por ejemplo, para una muestra sólida con un NMP de 70 coliformes por gramo, los límites de confianza en el 95% de los casos variarán de 10 a 230 coliformes por gramo (ejemplo 3 del cuadro 3) y en un producto con 24 de NMP de coliformes por gramo, los límites de confianza son de 3,6 a 130 coliformes por gramo (ejemplo 2 cuadro 3).~~

~~~~

**~~CUADRO 4. Indice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 10, 1,0 y 0,1g)~~**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | **~~3 tubos por diluciOn~~** | | **~~5 tubos por diluciOn~~** | | |
| ~~Combinación de positivos~~ | ~~Indice del NMP por g~~ | ~~95% Límites de confianza~~ | | ~~Indice del NMP por g~~ | ~~95% Límites de confianza~~ | |
| ~~bajo~~ | ~~alto~~ | ~~bajo~~ | ~~alto~~ |
| ~~0-0-0~~ | ~~< 0,03~~ | ~~<0,005~~ | ~~<0,09~~ | ~~<0,02~~ | ~~<0,005~~ | ~~<0,07~~ |
| ~~0-0-1~~ | ~~0,03~~ | ~~<0,005~~ | ~~<0,09~~ | ~~0,02~~ | ~~<0,005~~ | ~~0,07~~ |
| ~~0-1-0~~ | ~~0,03~~ | ~~<0,005~~ | ~~0,13~~ | ~~0,02~~ | ~~<0,005~~ | ~~0,07~~ |
| ~~0-2-0~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~0,04~~ | ~~<0,005~~ | ~~0,11~~ |
| ~~1-0-0~~ | ~~0,04~~ | ~~<0,005~~ | ~~0,20~~ | ~~0,02~~ | ~~<0,005~~ | ~~0,07~~ |
| ~~1-0-1~~ | ~~0,07~~ | ~~0,01~~ | ~~0,21~~ | ~~0,04~~ | ~~<0,005~~ | ~~0,11~~ |
| ~~1-1-0~~ | ~~0,07~~ | ~~0,01~~ | ~~0,23~~ | ~~0,04~~ | ~~<0,005~~ | ~~0,11~~ |
| ~~1-1-1~~ | ~~0,11~~ | ~~0,03~~ | ~~0,36~~ | ~~0,06~~ | ~~<0,005~~ | ~~0,15~~ |
| ~~1-2-0~~ | ~~0,11~~ | ~~0,03~~ | ~~0,36~~ | ~~0,06~~ | ~~<0,005~~ | ~~0,15~~ |
| ~~2-0-0~~ | ~~0,09~~ | ~~0,01~~ | ~~0,36~~ | ~~0,05~~ | ~~<0,005~~ | ~~0,13~~ |
| ~~2-0-1~~ | ~~0,14~~ | ~~0,03~~ | ~~0,37~~ | ~~0,07~~ | ~~0,01~~ | ~~0,17~~ |
| ~~2-1-0~~ | ~~0,15~~ | ~~0,03~~ | ~~0,44~~ | ~~0,07~~ | ~~0,01~~ | ~~0,17~~ |
| ~~2-1-1~~ | ~~0,20~~ | ~~0,07~~ | ~~0,89~~ | ~~0,09~~ | ~~0,02~~ | ~~0,21~~ |
| ~~2-2-0~~ | ~~0,21~~ | ~~0,04~~ | ~~0,47~~ | ~~0,09~~ | ~~0,02~~ | ~~0,21~~ |
| ~~2-2-1~~ | ~~0,28~~ | ~~0,10~~ | ~~1,50~~ | ~~----~~ | ~~---~~ | ~~---~~ |
| ~~2-3-0~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~0,12~~ | ~~0,03~~ | ~~0,28~~ |
| ~~3-0-0~~ | ~~0,23~~ | ~~0,04~~ | ~~1,20~~ | ~~0,08~~ | ~~0,01~~ | ~~0,19~~ |
| ~~3-0-1~~ | ~~0,39~~ | ~~0,07~~ | ~~1,3~~ | ~~0,11~~ | ~~0,02~~ | ~~0,25~~ |
| ~~3-0-2~~ | ~~0,64~~ | ~~0,15~~ | ~~3,80~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~---~~ |
| ~~3-1-0~~ | ~~0,43~~ | ~~0,07~~ | ~~2,1~~ | ~~0,11~~ | ~~0,02~~ | ~~0,25~~ |
| ~~3-1-1~~ | ~~0,75~~ | ~~0,14~~ | ~~2,3~~ | ~~0,14~~ | ~~0,04~~ | ~~0,34~~ |
| ~~3-1-2~~ | ~~1,20~~ | ~~0,30~~ | ~~3,8~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~---~~ |
| ~~3-2-0~~ | ~~0,93~~ | ~~0,15~~ | ~~3,80~~ | ~~0,14~~ | ~~0,04~~ | ~~0,34~~ |
| ~~3-2-1~~ | ~~1,50~~ | ~~0,30~~ | ~~4,40~~ | ~~0,17~~ | ~~0,05~~ | ~~0,46~~ |
| ~~3-2-2~~ | ~~2,10~~ | ~~0,35~~ | ~~4,70~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~--~~ |
| ~~3-3-0~~ | ~~2,40~~ | ~~0,36~~ | ~~13,0~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~--~~ |
| ~~3-3-1~~ | ~~4,60~~ | ~~0,71~~ | ~~24,0~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~--~~ |
| ~~3-3-2~~ | ~~11,0~~ | ~~1,50~~ | ~~48,0~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~--~~ |
| ~~3-3-3~~ | ~~>11.0~~ | ~~>1,50~~ | ~~>48.0~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~--~~ |
| ~~4-0-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~0,13~~ | ~~0,03~~ | ~~0,31~~ |
| ~~4-0-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~0,17~~ | ~~0,05~~ | ~~0,46~~ |
| ~~4-1-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~0,17~~ | ~~0,05~~ | ~~0,46~~ |
| ~~4-1-1~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~0,21~~ | ~~0,07~~ | ~~0,63~~ |
| ~~4-1-2~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~0,26~~ | ~~0,09~~ | ~~0,78~~ |
| ~~4-2-0~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~0,22~~ | ~~0,07~~ | ~~0,67~~ |
| ~~4-2-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~0,26~~ | ~~0,09~~ | ~~0,78~~ |
| ~~4-3-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~0,27~~ | ~~0,09~~ | ~~0,80~~ |
| ~~4-3-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~0,33~~ | ~~0,11~~ | ~~0,93~~ |
| ~~4-4-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~0,34~~ | ~~0,12~~ | ~~0,93~~ |
| ~~5-0-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~0,23~~ | ~~0,07~~ | ~~0,70~~ |
| ~~5-0-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~0,31~~ | ~~0,11~~ | ~~0,89~~ |
| ~~5-0-2~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~0,43~~ | ~~0,15~~ | ~~1,14~~ |
| ~~5-1-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~0,33~~ | ~~0,11~~ | ~~0,93~~ |
| ~~5-1-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~----~~ | ~~0,46~~ | ~~0,16~~ | ~~1,2~~ |
| ~~5-1-2~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~0,63~~ | ~~0,21~~ | ~~1,5~~ |
| ~~5-2-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~0,49~~ | ~~0,17~~ | ~~1,3~~ |
| ~~5-2-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~0,70~~ | ~~0,23~~ | ~~1,70~~ |
| ~~5-2-2~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~0,94~~ | ~~0,28~~ | ~~2,2~~ |
| ~~5-3-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~0,79~~ | ~~0,25~~ | ~~1,9~~ |
| ~~5-3-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~1,10~~ | ~~0,31~~ | ~~2,5~~ |
| ~~5-3-2~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~1,4~~ | ~~0,37~~ | ~~3,4~~ |
| ~~5-3-3~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~1,80~~ | ~~0,44~~ | ~~5,0~~ |
| ~~5-4-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~1,30~~ | ~~0,35~~ | ~~3,0~~ |
| ~~5-4-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~1,70~~ | ~~0,43~~ | ~~4,9~~ |
| ~~5-4-2~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~2,20~~ | ~~0,57~~ | ~~7,0~~ |
| ~~5-4-3~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~2,80~~ | ~~0,90~~ | ~~8,5~~ |
| ~~5-4-4~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~3,50~~ | ~~1,20~~ | ~~10,0~~ |
| ~~5-5-0~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~2,40~~ | ~~0,68~~ | ~~7,5~~ |
| ~~5-5-1~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~3,50~~ | ~~1,60~~ | ~~10,0~~ |
| ~~5-5-2~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~5,40~~ | ~~1,80~~ | ~~14,0~~ |
| ~~5-5-3~~ | ~~----~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~9,20~~ | ~~3,0~~ | ~~32,0~~ |
| ~~5-5-4~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~16,09~~ | ~~6,40~~ | ~~58,0~~ |
| ~~5-5-5~~ | ~~----~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~---~~ |

**~~CUADRO 5. Indice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 1,0, 0,1 y 0,01g)~~**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | **~~3 tubos por diluciOn~~** | | **~~5 tubos por diluciOn~~** | | |
| ~~Combinación de positivos~~ | ~~Indice del NMP por g~~ | ~~95% Límites de confianza~~ | | ~~Indice del NMP por g~~ | ~~95% Límites de confianza~~ | |
| ~~bajo~~ | ~~alto~~ | ~~bajo~~ | ~~alto~~ |
| ~~0-0-0~~ | ~~<0,3~~ | ~~<0,05~~ | ~~<0,9~~ | ~~<0,2~~ | ~~<0,05~~ | ~~<0,7~~ |
| ~~0-0-1~~ | ~~0,3~~ | ~~<0,05~~ | ~~<0,9~~ | ~~0,2~~ | ~~<0,05~~ | ~~0,7~~ |
| ~~0-1-0~~ | ~~0,3~~ | ~~<0,05~~ | ~~1,3~~ | ~~0,2~~ | ~~<0,05~~ | ~~0,7~~ |
| ~~0-2-0~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~0,4~~ | ~~<0,05~~ | ~~0,11~~ |
| ~~1-0-0~~ | ~~0,4~~ | ~~<0,05~~ | ~~2,0~~ | ~~0,2~~ | ~~<0,05~~ | ~~0,7~~ |
| ~~1-0-1~~ | ~~0,7~~ | ~~0,1~~ | ~~2,0~~ | ~~0,4~~ | ~~<0,05~~ | ~~1,1~~ |
| ~~1-1-0~~ | ~~0,7~~ | ~~0,1~~ | ~~2,3~~ | ~~0,4~~ | ~~<0,05~~ | ~~1,1~~ |
| ~~1-1-1~~ | ~~1,1~~ | ~~0,3~~ | ~~3,6~~ | ~~0,6~~ | ~~<0,05~~ | ~~1,5~~ |
| ~~1-2-0~~ | ~~1,1~~ | ~~0,3~~ | ~~3,6~~ | ~~0,6~~ | ~~<0,05~~ | ~~1,5~~ |
| ~~2-0-0~~ | ~~0,9~~ | ~~0,1~~ | ~~3,6~~ | ~~0,5~~ | ~~<0,05~~ | ~~1,3~~ |
| ~~2-0-1~~ | ~~1,4~~ | ~~0,3~~ | ~~3,7~~ | ~~0,7~~ | ~~0,1~~ | ~~1,7~~ |
| ~~2-1-0~~ | ~~1,5~~ | ~~0,3~~ | ~~4,4~~ | ~~0,7~~ | ~~0,1~~ | ~~1,7~~ |
| ~~2-1-1~~ | ~~2,0~~ | ~~0,7~~ | ~~8,9~~ | ~~0,9~~ | ~~0,2~~ | ~~2,1~~ |
| ~~2-2-0~~ | ~~2,1~~ | ~~0,4~~ | ~~4,7~~ | ~~0,9~~ | ~~0,2~~ | ~~2,1~~ |
| ~~2-2-1~~ | ~~2,8~~ | ~~1,0~~ | ~~15,0~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~---~~ |
| ~~2-3-0~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~1,2~~ | ~~0,3~~ | ~~2,8~~ |
| ~~3-0-0~~ | ~~2,3~~ | ~~0,4~~ | ~~12,0~~ | ~~0,8~~ | ~~0,1~~ | ~~1,9~~ |
| ~~3-0-1~~ | ~~3,9~~ | ~~0,7~~ | ~~13,0~~ | ~~1,1~~ | ~~0,2~~ | ~~2,5~~ |
| ~~3-0-2~~ | ~~6,4~~ | ~~1,5~~ | ~~38,0~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~--~~ |
| ~~3-1-0~~ | ~~4,3~~ | ~~0,7~~ | ~~21,0~~ | ~~1,1~~ | ~~0,2~~ | ~~2,5~~ |
| ~~3-1-1~~ | ~~7,5~~ | ~~1,4~~ | ~~23,0~~ | ~~1,4~~ | ~~0,4~~ | ~~3,4~~ |
| ~~3-1-2~~ | ~~12,0~~ | ~~3,0~~ | ~~38,0~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~--~~ |
| ~~3-2-0~~ | ~~9,3~~ | ~~1,5~~ | ~~38,0~~ | ~~1,4~~ | ~~0,4~~ | ~~3,4~~ |
| ~~3-2-1~~ | ~~15,0~~ | ~~3,0~~ | ~~44,0~~ | ~~1,7~~ | ~~0,5~~ | ~~4,6~~ |
| ~~3-2-2~~ | ~~21,0~~ | ~~3,5~~ | ~~47,0~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~--~~ |
| ~~3-3-0~~ | ~~24,0~~ | ~~3,6~~ | ~~130,0~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~--~~ |
| ~~3-3-1~~ | ~~46,0~~ | ~~7,1~~ | ~~240,0~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~--~~ |
| ~~3-3-2~~ | ~~110,0~~ | ~~15,0~~ | ~~480,0~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~--~~ |
| ~~3-3-3~~ | ~~>110,0~~ | ~~>15,0~~ | ~~>480,0~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~--~~ |
| ~~4-0-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~1,3~~ | ~~0,3~~ | ~~3,1~~ |
| ~~4-0-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~1,7~~ | ~~0,5~~ | ~~4,6~~ |
| ~~4-1-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~1,7~~ | ~~0,5~~ | ~~4,6~~ |
| ~~4-1-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~2,1~~ | ~~0,7~~ | ~~6,3~~ |
| ~~4-1-2~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~2,6~~ | ~~0,9~~ | ~~7,8~~ |
| ~~4-2-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~2,2~~ | ~~0,7~~ | ~~6,7~~ |
| ~~4-2-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~2,6~~ | ~~0,9~~ | ~~7,8~~ |
| ~~4-3-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~2,7~~ | ~~0,9~~ | ~~8,0~~ |
| ~~4-3-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~3,3~~ | ~~1,1~~ | ~~9,3~~ |
| ~~4-4-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~3,4~~ | ~~1,2~~ | ~~3,~~ |
| ~~5-0-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~2,3~~ | ~~0,7~~ | ~~7,0~~ |
| ~~5-0-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~3,1~~ | ~~1,1~~ | ~~8,9~~ |
| ~~5-0-2~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~4,3~~ | ~~1,5~~ | ~~11,4~~ |
| ~~5-1-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~3,3~~ | ~~1,1~~ | ~~9,3~~ |
| ~~5-1-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~4,6~~ | ~~1,6~~ | ~~12,0~~ |
| ~~5-1-2~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~6,3~~ | ~~2,1~~ | ~~15,0~~ |
| ~~5-2-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~4,9~~ | ~~1,7~~ | ~~13,0~~ |
| ~~5-2-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~7,0~~ | ~~2,3~~ | ~~17,0~~ |
| ~~5-2-2~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~9,4~~ | ~~2,8~~ | ~~22,0~~ |
| ~~5-3-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~7,9~~ | ~~2,5~~ | ~~19,0~~ |
| ~~5-3-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~11,0~~ | ~~3,1~~ | ~~25,0~~ |
| ~~5-3-2~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~14,0~~ | ~~3,7~~ | ~~34,0~~ |
| ~~5-3-3~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~18,0~~ | ~~4,4~~ | ~~50,0~~ |
| ~~5-4-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~13,0~~ | ~~3,5~~ | ~~30,0~~ |
| ~~5-4-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~17,0~~ | ~~4,3~~ | ~~49,0~~ |
| ~~5-4-2~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~22,0~~ | ~~5,7~~ | ~~70,0~~ |
| ~~5-4-3~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~28,0~~ | ~~9,0~~ | ~~85,0~~ |
| ~~5-4-4~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~35,0~~ | ~~12,0~~ | ~~100,0~~ |
| ~~5-5-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~24,0~~ | ~~6,8~~ | ~~75,0~~ |
| ~~5-5-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~35,0~~ | ~~12,0~~ | ~~100,0~~ |
| ~~5-5-2~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~54,0~~ | ~~18,0~~ | ~~140,0~~ |
| ~~5-5-3~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~92,0~~ | ~~30,0~~ | ~~320,0~~ |
| ~~5-5-4~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~161,0~~ | ~~64,0~~ | ~~580,0~~ |
| ~~5-5-5~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~>161,0~~ | ~~>64,0~~ | ~~>580,0~~ |

**~~CUADRO 6. Indice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 0,1, 0,001 y 0,0001 g)~~**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | **~~3 tubos por diluciOn~~** | | **~~5 tubos por diluciOn~~** | | |
| ~~Combinación de positivos~~ | ~~Indice del NMP por g~~ | ~~95% Límites de confianza~~ | | ~~Indice del NMP por g~~ | ~~95% Límites de confianza~~ | |
| ~~bajo~~ | ~~Alto~~ | ~~bajo~~ | ~~alto~~ |
| ~~0-0-0~~ | ~~<3~~ | ~~<0,5~~ | ~~<9~~ | ~~<2~~ | ~~<0,5~~ | ~~<7~~ |
| ~~0-0-1~~ | ~~3~~ | ~~<0,5~~ | ~~<9~~ | ~~2~~ | ~~<0,5~~ | ~~7~~ |
| ~~0-1-0~~ | ~~3~~ | ~~<0,5~~ | ~~13~~ | ~~2~~ | ~~<0,5~~ | ~~7~~ |
| ~~0-2-0~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~4~~ | ~~<0,5~~ | ~~11~~ |
| ~~1-0-0~~ | ~~4~~ | ~~<0,5~~ | ~~20~~ | ~~2~~ | ~~<0,5~~ | ~~7~~ |
| ~~1-0-1~~ | ~~7~~ | ~~1~~ | ~~21~~ | ~~4~~ | ~~<0,5~~ | ~~11~~ |
| ~~1-1-0~~ | ~~7~~ | ~~1~~ | ~~23~~ | ~~4~~ | ~~<0,5~~ | ~~11~~ |
| ~~1-1-1~~ | ~~11~~ | ~~3~~ | ~~36~~ | ~~6~~ | ~~<0,5~~ | ~~15~~ |
| ~~1-2-0~~ | ~~11~~ | ~~3~~ | ~~36~~ | ~~6~~ | ~~<0,5~~ | ~~15~~ |
| ~~2-0-0~~ | ~~9~~ | ~~1~~ | ~~36~~ | ~~5~~ | ~~<0,5~~ | ~~13~~ |
| ~~2-0-1~~ | ~~14~~ | ~~3~~ | ~~37~~ | ~~7~~ | ~~1,0~~ | ~~17~~ |
| ~~2-1-0~~ | ~~15~~ | ~~3~~ | ~~44~~ | ~~7~~ | ~~1,0~~ | ~~17~~ |
| ~~2-1-1~~ | ~~20~~ | ~~7~~ | ~~89~~ | ~~9~~ | ~~2~~ | ~~21~~ |
| ~~2-2-0~~ | ~~21~~ | ~~4~~ | ~~47~~ | ~~9~~ | ~~2~~ | ~~21~~ |
| ~~2-2-1~~ | ~~28~~ | ~~10~~ | ~~150~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~---~~ |
| ~~2-3-0~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~12~~ | ~~3~~ | ~~28~~ |
| ~~3-0-0~~ | ~~23~~ | ~~4~~ | ~~120~~ | ~~8~~ | ~~1~~ | ~~19~~ |
| ~~3-0-1~~ | ~~39~~ | ~~7~~ | ~~13,0~~ | ~~11~~ | ~~2~~ | ~~25~~ |
| ~~3-0-2~~ | ~~64~~ | ~~15~~ | ~~380~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~--~~ |
| ~~3-1-0~~ | ~~43~~ | ~~7~~ | ~~210~~ | ~~11~~ | ~~2~~ | ~~25~~ |
| ~~3-1-1~~ | ~~75~~ | ~~14~~ | ~~230~~ | ~~14~~ | ~~4~~ | ~~34~~ |
| ~~3-1-2~~ | ~~120~~ | ~~30~~ | ~~380~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~--~~ |
| ~~3-2-0~~ | ~~93~~ | ~~15~~ | ~~380~~ | ~~14~~ | ~~4~~ | ~~34~~ |
| ~~3-2-1~~ | ~~150~~ | ~~30~~ | ~~440~~ | ~~17~~ | ~~5~~ | ~~46~~ |
| ~~3-2-2~~ | ~~210~~ | ~~35~~ | ~~470~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~--~~ |
| ~~3-3-0~~ | ~~240~~ | ~~36~~ | ~~130,0~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~--~~ |
| ~~3-3-1~~ | ~~460~~ | ~~71~~ | ~~240,0~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~--~~ |
| ~~3-3-2~~ | ~~1100~~ | ~~150~~ | ~~480,0~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~--~~ |
| ~~3-3-3~~ | ~~>1100~~ | ~~>150~~ | ~~>480,0~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~--~~ |
| ~~4-0-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~13~~ | ~~3~~ | ~~31~~ |
| ~~4-0-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~17~~ | ~~5~~ | ~~46~~ |
| ~~4-1-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~17~~ | ~~5~~ | ~~46~~ |
| ~~4-1-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~21~~ | ~~7~~ | ~~63~~ |
| ~~4-1-2~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~26~~ | ~~9~~ | ~~78~~ |
| ~~4-2-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~22~~ | ~~7~~ | ~~67~~ |
| ~~4-2-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~26~~ | ~~9~~ | ~~78~~ |
| ~~4-3-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~27~~ | ~~9~~ | ~~80~~ |
| ~~4-3-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~33~~ | ~~11~~ | ~~93~~ |
| ~~4-4-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~34~~ | ~~12~~ | ~~93~~ |
| ~~5-0-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~23~~ | ~~7~~ | ~~7~~ |
| ~~5-0-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~31~~ | ~~11~~ | ~~89~~ |
| ~~5-0-2~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~43~~ | ~~15~~ | ~~114~~ |
| ~~5-1-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~33~~ | ~~11~~ | ~~93~~ |
| ~~5-1-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~46~~ | ~~16~~ | ~~120~~ |
| ~~5-1-2~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~63~~ | ~~21~~ | ~~150~~ |
| ~~5-2-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~49~~ | ~~17~~ | ~~130~~ |
| ~~5-2-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~70~~ | ~~23~~ | ~~170~~ |
| ~~5-2-2~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~94~~ | ~~28~~ | ~~220~~ |
| ~~5-3-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~79~~ | ~~25~~ | ~~190~~ |
| ~~5-3-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~110~~ | ~~31~~ | ~~250~~ |
| ~~5-3-2~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~140~~ | ~~37~~ | ~~340~~ |
| ~~5-3-3~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~180~~ | ~~44~~ | ~~500~~ |
| ~~5-4-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~130~~ | ~~35~~ | ~~300~~ |
| ~~5-4-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~170~~ | ~~43~~ | ~~490~~ |
| ~~5-4-2~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~220~~ | ~~57~~ | ~~700~~ |
| ~~5-4-3~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~280~~ | ~~90~~ | ~~850~~ |
| ~~5-4-4~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~350~~ | ~~120~~ | ~~1000~~ |
| ~~5-5-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~240~~ | ~~68~~ | ~~750~~ |
| ~~5-5-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~350~~ | ~~120~~ | ~~1000~~ |
| ~~5-5-2~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~540~~ | ~~180~~ | ~~1400~~ |
| ~~5-5-3~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~920~~ | ~~300~~ | ~~3200~~ |
| ~~5-5-4~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~1600~~ | ~~640~~ | ~~5800~~ |
| ~~5-5-5~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~>1600~~ | ~~>640~~ | ~~>5800~~ |

**~~CUADRO 7. Indice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 0,01, 0,001 y 0,0001 g)~~**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | **~~3 tubos por diluciOn~~** | | **~~5 tubos por diluciOn~~** | | |
| ~~Combinación de positivos~~ | ~~Indice del NMP por g~~ | ~~95% Límites de confianza~~ | | ~~Indice del NMP por g~~ | ~~95% Límites de confianza~~ | |
| ~~bajo~~ | ~~Alto~~ | ~~bajo~~ | ~~alto~~ |
| ~~0-0-0~~ | ~~<30~~ | ~~<5~~ | ~~<90~~ | ~~<20~~ | ~~<5~~ | ~~<70~~ |
| ~~0-0-1~~ | ~~30~~ | ~~<5~~ | ~~<90~~ | ~~20~~ | ~~<5~~ | ~~70~~ |
| ~~0-1-0~~ | ~~30~~ | ~~<5~~ | ~~130~~ | ~~20~~ | ~~<5~~ | ~~70~~ |
| ~~0-2-0~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~40~~ | ~~<5~~ | ~~110~~ |
| ~~1-0-0~~ | ~~40~~ | ~~<5~~ | ~~200~~ | ~~20~~ | ~~<5~~ | ~~70~~ |
| ~~1-0-1~~ | ~~70~~ | ~~10~~ | ~~210~~ | ~~40~~ | ~~<5~~ | ~~110~~ |
| ~~1-1-0~~ | ~~70~~ | ~~10~~ | ~~230~~ | ~~40~~ | ~~<5~~ | ~~110~~ |
| ~~1-1-1~~ | ~~110~~ | ~~30~~ | ~~360~~ | ~~60~~ | ~~<5~~ | ~~150~~ |
| ~~1-2-0~~ | ~~110~~ | ~~30~~ | ~~360~~ | ~~60~~ | ~~<5~~ | ~~150~~ |
| ~~2-0-0~~ | ~~90~~ | ~~10~~ | ~~360~~ | ~~50~~ | ~~<5~~ | ~~130~~ |
| ~~2-0-1~~ | ~~140~~ | ~~30~~ | ~~370~~ | ~~70~~ | ~~10~~ | ~~170~~ |
| ~~2-1-0~~ | ~~150~~ | ~~30~~ | ~~440~~ | ~~70~~ | ~~10~~ | ~~170~~ |
| ~~2-1-1~~ | ~~200~~ | ~~70~~ | ~~890~~ | ~~90~~ | ~~20~~ | ~~210~~ |
| ~~2-2-0~~ | ~~210~~ | ~~40~~ | ~~470~~ | ~~90~~ | ~~20~~ | ~~210~~ |
| ~~2-2-1~~ | ~~280~~ | ~~100~~ | ~~1500~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~---~~ |
| ~~2-3-0~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~120~~ | ~~30~~ | ~~280~~ |
| ~~3-0-0~~ | ~~230~~ | ~~40~~ | ~~1200~~ | ~~80~~ | ~~10~~ | ~~190~~ |
| ~~3-0-1~~ | ~~390~~ | ~~70~~ | ~~1300~~ | ~~110~~ | ~~20~~ | ~~250~~ |
| ~~3-0-2~~ | ~~640~~ | ~~150~~ | ~~3800~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~--~~ |
| ~~3-1-0~~ | ~~430~~ | ~~70~~ | ~~2100~~ | ~~110~~ | ~~20~~ | ~~250~~ |
| ~~3-1-1~~ | ~~750~~ | ~~140~~ | ~~2300~~ | ~~140~~ | ~~40~~ | ~~340~~ |
| ~~3-1-2~~ | ~~1200~~ | ~~300~~ | ~~3800~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~--~~ |
| ~~3-2-0~~ | ~~930~~ | ~~150~~ | ~~3800~~ | ~~140~~ | ~~40~~ | ~~340~~ |
| ~~3-2-1~~ | ~~1500~~ | ~~300~~ | ~~4400~~ | ~~170~~ | ~~50~~ | ~~460~~ |
| ~~3-2-2~~ | ~~2100~~ | ~~350~~ | ~~4700~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~--~~ |
| ~~3-3-0~~ | ~~2400~~ | ~~360~~ | ~~13000~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~--~~ |
| ~~3-3-1~~ | ~~4600~~ | ~~710~~ | ~~24000~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~--~~ |
| ~~3-3-2~~ | ~~11000~~ | ~~1500~~ | ~~48000~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~--~~ |
| ~~3-3-3~~ | ~~>11000~~ | ~~>1500~~ | ~~>48000~~ | ~~--~~ | ~~--~~ | ~~--~~ |
| ~~4-0-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~130~~ | ~~30~~ | ~~310~~ |
| ~~4-0-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~170~~ | ~~50~~ | ~~460~~ |
| ~~4-1-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~170~~ | ~~50~~ | ~~460~~ |
| ~~4-1-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~210~~ | ~~70~~ | ~~630~~ |
| ~~4-1-2~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~260~~ | ~~90~~ | ~~780~~ |
| ~~4-2-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~220~~ | ~~70~~ | ~~670~~ |
| ~~4-2-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~260~~ | ~~90~~ | ~~780~~ |
| ~~4-3-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~270~~ | ~~90~~ | ~~800~~ |
| ~~4-3-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~330~~ | ~~110~~ | ~~930~~ |
| ~~4-4-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~340~~ | ~~120~~ | ~~930~~ |
| ~~5-0-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~230~~ | ~~70~~ | ~~700~~ |
| ~~5-0-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~310~~ | ~~110~~ | ~~890~~ |
| ~~5-0-2~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~430~~ | ~~150~~ | ~~1140~~ |
| ~~5-1-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~330~~ | ~~110~~ | ~~930~~ |
| ~~5-1-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~460~~ | ~~160~~ | ~~1200~~ |
| ~~5-1-2~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~630~~ | ~~210~~ | ~~1500~~ |
| ~~5-2-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~490~~ | ~~170~~ | ~~1300~~ |
| ~~5-2-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~700~~ | ~~230~~ | ~~1700~~ |
| ~~5-2-2~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~940~~ | ~~280~~ | ~~2200~~ |
| ~~5-3-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~790~~ | ~~250~~ | ~~1900~~ |
| ~~5-3-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~1100~~ | ~~310~~ | ~~2500~~ |
| ~~5-3-2~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~1400~~ | ~~370~~ | ~~3400~~ |
| ~~5-3-3~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~1800~~ | ~~440~~ | ~~5000~~ |
| ~~5-4-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~1300~~ | ~~350~~ | ~~3000~~ |
| ~~5-4-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~1700~~ | ~~430~~ | ~~4900~~ |
| ~~5-4-2~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~2200~~ | ~~570~~ | ~~7000~~ |
| ~~5-4-3~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~2800~~ | ~~900~~ | ~~8500~~ |
| ~~5-4-4~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~3500~~ | ~~1200~~ | ~~10000~~ |
| ~~5-5-0~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~2400~~ | ~~680~~ | ~~7500~~ |
| ~~5-5-1~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~3500~~ | ~~1200~~ | ~~10000~~ |
| ~~5-5-2~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~5400~~ | ~~1800~~ | ~~14000~~ |
| ~~5-5-3~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~9200~~ | ~~3000~~ | ~~32000~~ |
| ~~5-5-4~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~16000~~ | ~~6400~~ | ~~58000~~ |
| ~~5-5-5~~ | ~~--~~ | ~~---~~ | ~~---~~ | ~~>16000~~ | ~~>6400~~ | ~~>58000~~ |

**~~B.12.7 Informe de la prueba~~**

~~Informar "Número más probable (NMP) de coliformes por gramo o mililitro de muestra".~~

~~En caso de muestras de agua informar NMP/100 ml.~~

**B.13. METODO PARA LA CUENTA DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES EN PLACA.**

**B.13.1 Fundamento**

El método permite determinar el número de microorganismos coliformes presentes en una muestra, utilizando un medio selectivo (agar rojo violeta bilis) en el que se desarrollan bacterias a 35°C en aproximadamente 24 h, dando como resultado la producción de gas y ácidos orgánicos, los cuales viran el indicador de pH y precipitan las sales biliares.

**B.13.2 Reactivos y materiales**

**B.13.2.1** Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan, deben ser grado analítico y cuando se indique agua debe entenderse como agua destilada.

**B.13.2.1.1** Soluciones diluyentes

**B.13.2.1.1.1** Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada)

|  |  |
| --- | --- |
| **FORMULA** | |
| **Ingredientes** | **Cantidades** |
| Fosfato monopotásico | 34,0 g |
| Agua | 1,0 l |

**Preparación**: Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1,0 N. Llevar con agua a un litro. Esterilizar a 121± 1,0°C durante 15 minutos. Conservar en refrigeración (solución concentrada). Tomar 1,25 ml de la solución concentrada y llevar a un litro con agua (solución de trabajo). Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera. Esterilizar durante 15 minutos a 121± 1,0°C. Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

**B.13.2.1.1.2** Agua Peptonada

|  |  |
| --- | --- |
| **FORMULA** | |
| **Ingredientes** | **Cantidades** |
| Peptona | 1,0 g |
| NaCl | 8,5 g |
| Agua | 1,0 l |

**Preparación:** Disolver los componentes en un litro de agua. Ajustar el pH a 7,0 con hidróxido de sodio 1,0 N. Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera. Esterilizar durante 15 minutos a 121 ± 1,0°C. Después de la esterilización, los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales. Si este diluyente no es usado inmediatamente, almacenar en lugar obscuro a una temperatura entre 0 a 5°C por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición.

**B.13.2.1.2** Medio de Cultivo

Agar-rojo- violeta-bilis-lactosa (RVBA)

|  |  |
| --- | --- |
| **FORMULA** | |
| **Ingredientes** | **Cantidades** |
| Peptona | 7,0 g |
| Extracto de levadura | 3,0 g |
| Lactosa | 10,0 g |
| Sales biliares | 1,5 g |
| Cloruro de sodio | 5,0 g |
| Rojo neutro | 0,03 g |
| Cristal violeta | 0,002 g |
| Agar | 15,0 g |
| Agua | 1,0 l |

**Preparación:** Mezclar los componentes en el agua y dejar reposar durante algunos minutos. Mezclar perfectamente y ajustar el pH a 7,4 con ácido clorhídrico 0,1N o con hidróxido de sodio 0,1N a 25°C, de forma que después del calentamiento se mantenga en este valor. Calentar con agitación constante y hervir durante 2 minutos. Enfriar inmediatamente el medio en un baño de agua hasta que llegue a 45°C. Evitar el sobrecalentamiento del medio. No debe esterilizarse en autoclave. Usar el medio dentro de las tres primeras horas después de su preparación. En el caso de utilizar medio de cultivo deshidratado, seguir las instrucciones del fabricante.

**B.13.2.2 Materiales**

Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 ml (o si es necesario de 11 y 2 ml), con tapón de algodón. Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.

Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.

Tubos de 16 X 150 mm con tapón de rosca.

Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.

Cajas Petri.

Todo el material e instrumentos que tengan contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse mediante:

Horno, durante 2 h a 170 - 175°C, o 1 h a 180°C; o en autoclave, durante 15 minutos como mínimo a 121 ± 1,0°C.

El material de vidrio puede sustituirse por material desechable que cumpla con las especificaciones deseadas. No debe usarse material de vidrio dañado por las esterilizaciones repetidas y éste debe ser químicamente inerte.

**B.13.3 Aparatos e instrumentos**

Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima

de 170°C.

Autoclave con termómetro y manómetro, calibrada con termómetro de máximas y mínimas.

Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de 0,1° C y que mantenga la temperatura a 45 ± 1,0°C.

Vasos para licuadora con tapa esterilizables o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico.

Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de ± 1,0° C, provista con termómetro calibrado.

Contador de colonias de campo oscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadriculada y lente amplificador.

Registrador mecánico o electrónico.

Microscopio óptico.

Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH a 25 °C.

**B.13.4 Preparación de la muestra**

La preparación de la muestra debe ser de acuerdo a lo establecido en el método de Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

**B.13.5 Procedimiento**

**B.13.5.1** Colocar en cajas Petri por duplicado 1 ml de la muestra líquida directa o de la dilución primaria, utilizando para tal propósito una pipeta estéril.

**B.13.5.2** Repetir el procedimiento tantas veces como diluciones decimales se requiera sembrar, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución.

**B.13.5.3** Verter de 15 a 20 ml del medio RVBA fundido y mantenido a 45 ± 1,0°C en baño de agua. En el caso de utilizar cajas de Petri de plástico se vierte de 10 a 15 ml del medio. El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el momento en que se vierte el medio de cultivo, no debe exceder de 20 minutos.

**B.13.5.4** Mezclar cuidadosamente el inóculo con el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, seis movimientos en el sentido contrario al de las manecillas del reloj y seis de atrás para adelante, sobre una superficie lisa y nivelada. Permitir que la mezcla solidifique dejando las cajas Petri reposar sobre una superficie horizontal fría.

**B.13.5.5** Preparar una caja control con 15 ml de medio para verificar la esterilidad.

**B.13.5.6** Después de que está el medio completamente solidificado en la caja, verter aproximadamente 4 ml del medio RVBA a 45 ± 1,0°C en la superficie del medio inoculado. Dejar que solidifique.

**B.13.5.7** Invertir las placas y colocarlas en la incubadora a 35°C, durante 24 ± 2 horas.

**B.13.5.8** Después del período especificado para la incubación, contar las colonias con el contador de colonias.

**B.13.5.9** Seleccionar las placas que contengan entre 15 y 150 colonias. Las colonias típicas son de color rojo oscuro, generalmente se encuentran rodeadas de un halo de precipitación debido a las sales biliares, el cual es de color rojo claro o rosa, la morfología colonial es semejante a lentes biconvexos con un diámetro de 0,5 a 2,0 mm.

**B.13.6 Expresión de los resultados**

**B.13.6.1** Cálculo del Método

**B.13.6.1.1** Placas que contienen entre 15 y 150 colonias características.

Separar las placas que contienen el número antes mencionado de colonias características en dos diluciones consecutivas. Contar las colonias presentes. Calcular el número de coliformes por mililitro o por gramo de producto, multiplicando el número de colonias por el inverso de la dilución correspondiente, tomando los criterios del método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa.

**B.13.6.1.2** Placas que contienen menos de 15 colonias características.

Si cada una de las placas tiene menos de 15 colonias características, reportar el número obtenido seguido de la dilución correspondiente.

**B.13.6.1.3** Placas con colonias no características.

Si en las placas no hay colonias características, reportar el resultado como: menos de un coliforme por 1/d por gramo, en donde d es el factor de dilución.

**B.13.7 Informe de la prueba**

Informar: UFC/g o ml en placa de agar rojo violeta bilis, incubados a 35°C durante 24 ± 2 h.

En caso de emplear diluciones y no observar crecimiento, informar utilizando como referencia la dilución más baja utilizada, por ejemplo dilución 10-1.

En caso de no observar crecimiento en la muestra sin diluir se informa: "no desarrollo de coliformes por ml".

**~~B.14. METODO PARA LA DETERMINACION DE~~** *~~Salmonella~~* **~~EN ALIMENTOS.~~ (Este Capítulo quedará sin efectos a los 360 días naturales siguientes a la entrada en vigor de la NOM-210-SSA1-2014, Art. Tercero Transitorio de la mencionada NOM publicada el 26/VI/2015).**

**~~B.14.1 Fundamento~~**

~~La presente técnica para la detección de~~ *~~Salmonella~~* ~~en alimentos, describe un esquema general que consiste de 5 pasos básicos:~~

**~~B.14.1.1~~** ~~Preenriquecimiento, es el paso donde la muestra es enriquecida en un medio nutritivo no selectivo, que permite restaurar las células de~~ *~~Salmonella~~* ~~dañadas a una condición fisiológica estable.~~

**~~B.14.1.2~~** ~~Enriquecimiento selectivo, empleado con el propósito de incrementar las poblaciones de~~ *~~Salmonella~~* ~~e inhibir otros organismos presentes en la muestra.~~

**~~B.14.1.3~~** ~~Selección en medios sólidos, en este paso se utilizan medios selectivos que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a~~ *~~Salmonella~~* ~~y permite el reconocimiento visual de colonias sospechosas.~~

**~~B.14.1.4~~** ~~Identificación bioquímica, este paso permite la identificación génerica de los cultivos de~~ *~~Salmonella~~* ~~y la eliminación de cultivos sospechosos falsos.~~

**~~B.14.1.5~~** ~~Serotipificación, es una técnica serológica que permite la identificación específica de un cultivo.~~

**~~B.14.2 Reactivos y materiales~~**

~~En caso de disponerse de fórmulas comerciales deshidratadas, se deben seguir las instrucciones impresas en la etiqueta respectiva para su preparación.~~

~~Las sustancias químicas usadas para preparar los medios de cultivo y los reactivos deben ser grado analítico.~~

**~~B.14.2.1 Reactivos~~**

**~~B.14.2.1.1 Medios de pre-enriquecimiento~~**

**~~B.14.2.1.1.1~~** ~~Agua de peptona tamponada~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~FORMULA~~** | |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Peptona~~ | ~~10,0 g~~ |
| ~~Cloruro sódico~~ | ~~5,0 g~~ |
| ~~Fosfato sódico dibásico~~ | ~~3,5 g~~ |
| ~~Fosfato potásico monobásico~~ | ~~1,5 g~~ |
| ~~Agua~~ | ~~1,0 l~~ |

**~~Preparación:~~** ~~Disolver los componentes en agua, calentando si es necesario. Ajustar el pH, si es necesario, después de la esterilización a 7,0. Distribuir en recipientes de vidrio esterilizables con la capacidad necesaria para obtener las porciones necesarias para la prueba. Esterilizar por 20 min a 121 ± 1°C~~

**~~B.14.2.1.1.2~~** ~~Caldo lactosado~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~FORMULA~~** | |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Extracto de carne~~ | ~~3,0 g~~ |
| ~~Peptona~~ | ~~5,0 g~~ |
| ~~Lactosa~~ | ~~5,0 g~~ |
| ~~Agua destilada~~ | ~~1,0 l~~ |

~~pH final: 6,9 ± 0,2~~

**~~Preparación:~~** ~~Disolver los ingredientes en agua, calentando a 65°C. Distribuir en porciones de 225 ml, en frascos de 500 ml.. Esterilizar durante 15 min a 121°C ± 1°C~~

**~~B.14.2.1.2 Caldo de enriquecimiento~~**

**~~B.14.2.1.2.1~~** ~~Caldo selenito-cistina~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~FORMULA~~** | |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Triptona o polipeptona~~ | ~~5,00 g~~ |
| ~~Lactosa~~ | ~~4,00 g~~ |
| ~~Fosfato disódico~~ | ~~10,00 g~~ |
| ~~Selenito ácido de sodio~~ | ~~4,00 g~~ |
| ~~L-cistina~~ | ~~0,01 g~~ |
| ~~Agua destilada~~ | ~~1,00 l~~ |

~~pH final: 7,0 ± 0,2 a 25°C~~

**~~Preparación~~**~~: Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada estéril y distribuir en volúmenes de 10 y 225 ml en recipientes estériles, según se requiera. El caldo así preparado es transparente. De preferencia usarlo el mismo día de su preparación. Si se desea conservar el medio por varios días, puede exponerse al calor en autoclave por 5 min a 110°C ± 1°C, tomando entonces un color salmón.~~

**~~B.14.2.1.2.2~~** ~~Caldo tetrationato~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~FORMULA~~** | |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Proteosa peptona o tristona~~ | ~~5,0 g~~ |
| ~~Sales biliares~~ | ~~1,0 g~~ |
| ~~Carbonato de calcio~~ | ~~10,0 g~~ |
| ~~Tiosulfato de sodio pentahidratado~~ | ~~30,0 g~~ |
| ~~Agua destilada~~ | ~~1,0 l~~ |

~~pH final: 7,0 ± 0,1~~

**~~Preparación:~~** ~~Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada estéril. Distribuir, agitando constantemente, en porciones de 10 y 225 ml, en recipientes estériles. Guardar en refrigeración. Antes de usar el medio, agregar 2 ml de una solución yodo-yoduro y 1 ml de solución de verde brillante al 0,1% por cada 100 ml de caldo. El medio una vez adicionado de yodo no debe calentarse y debe usarse el mismo día de su preparación.~~

**~~B.14.2.1.2.3~~** ~~Vassiliadis-Rappaport~~

**~~Solución A~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~FORMULA~~** | |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Tristona~~ | ~~5,0 g~~ |
| ~~Cloruro de sodio~~ | ~~8,0 g~~ |
| ~~Fosfato de potasio dihidrogenado~~ | ~~1,6 g~~ |
| ~~Agua destilada~~ | ~~1,0 l~~ |

~~Disolver los componentes en agua por calentamiento cercano a 70°C~~

**~~Solución B~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~FORMULA~~** | |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Cloruro de magnesio hexahidratado~~ | ~~400,0 g~~ |
| ~~Agua destilada~~ | ~~1,0 l~~ |

~~Disolver el cloruro de magnesio en agua. Como esta sal es muy higroscópica es conveniente disolver el contenido entero de cloruro de magnesio desde un recipiente recientemente abierto de tal modo que la concentración de la solución sea de 0,4 g/ml. Conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.~~

**~~Solución C~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Oxalato de verde de malaquita~~ | ~~0,4g~~ |
| ~~Agua destilada~~ | ~~100,0 ml~~ |

~~Disolver el oxalato de verde de malaquita en agua. Conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.~~

**~~Medio completo~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~solución A~~ | ~~1 000 ml~~ |
| ~~solución B~~ | ~~100 ml~~ |
| ~~solución C~~ | ~~10 ml~~ |

**~~Preparación:~~** ~~Adicionar 1 000 ml de la solución A, 100 ml de la solución B y 10 ml de la solución C. Ajustar el pH si es necesario, de tal manera que después de la esterilización sea de 5,2. Distribuir antes de usar dentro de tubos en cantidades de 10 ml. Almacenar en refrigeración.~~

**~~B.14.2.1.2.4~~** ~~Caldo de Soya Tripticasa~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~FORMULA~~** | |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Tripticasa o triptosa~~ | ~~17,0 g~~ |
| ~~Fitona~~ | ~~3,0 g~~ |
| ~~Glucosa~~ | ~~2,5 g~~ |
| ~~Cloruro de sodio~~ | ~~2,5 g~~ |
| ~~Agua destilada~~ | ~~1,0 l~~ |

~~pH final: 7,3 ± 0,2~~

**~~Preparación:~~** ~~Disolver los ingredientes en 1 litro de agua destilada, calentando lentamente hasta su disolución completa. Distribuir porciones de 225 ml dentro de matraces de 500 ml y esterilizar en autoclave durante 15 min a 121°C ± 1°C.~~

**~~B.14.2.1.2.5~~** ~~Leche descremada reconstituida~~

~~Suspender 100 g de leche descremada en polvo en un litro de agua destilada. Agitar circularmente hasta disolución. Distribuir en volúmenes de 225 ml en matraces Erlenmeyer de 500 ml. Esterilizar a 121 °C ± 1°C por 15 min. El volumen final debe corregirse para mantener 225 ml.~~

**~~B.14.2.1.2.6~~** ~~Caldo soya tripticasa estéril adicionado con sulfito de potasio.~~

~~Adicionar al caldo soya tripticasa 5 g de sulfito de potasio por cada 1000 ml de medio, quedando una concentración final de sulfito de potasio del 0,5%. Adicionar el sulfito de potasio antes de esterilizar en autoclave en la forma habitual.~~

**~~B.14.2.1.3 Medios de Aislamiento~~**

**~~B.14.2.1.3.1~~** ~~Agar verde brillante (VB)~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~FORMULA~~** | |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Extracto de levadura~~ | ~~3,0000g~~ |
| ~~Polipeptona (Proteosa peptona No. 3)~~ | ~~10,0000g~~ |
| ~~Cloruro de sodio~~ | ~~5,0000g~~ |
| ~~Lactosa~~ | ~~10,0000g~~ |
| ~~Sacarosa~~ | ~~10,0000g~~ |
| ~~Rojo de fenol~~ | ~~0,0800g~~ |
| ~~Agar~~ | ~~20,0000g~~ |
| ~~Verde brillante~~ | ~~0,0125g~~ |
| ~~Agua destilada~~ | ~~1,0000l~~ |

~~pH final: 6,9 ± 0,2~~

**~~Preparación:~~** ~~Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada y calentar a ebullición, hasta disolución completa. Ajustar el pH. Esterilizar en autoclave por 15 min a 121°C ± 1°C. El sobrecalentamiento del medio disminuye su selectividad. Enfriar el medio a 50°C y distribuirlo en cajas de petri estériles. El aspecto del medio es obscuro, de color marrón.~~

**~~B.14.2.1.3.2~~** ~~Agar con sulfito de bismuto~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Extracto de carne de res~~ | ~~5,000g~~ |
| ~~Mezcla de peptonas~~ | ~~10,000g~~ |
| ~~Glucosa~~ | ~~5,000g~~ |
| ~~Fosfato disódico (anhidro)~~ | ~~5,000g~~ |
| ~~Sulfato ferroso (anhidro)~~ | ~~0,300g~~ |
| ~~Sulfito de bismuto~~ | ~~8,000g~~ |
| ~~Verde brillante~~ | ~~0,025g~~ |
| ~~Agar~~ | ~~20,000g~~ |
| ~~Agua destilada~~ | ~~1,000l~~ |

~~pH final: 7,6 ± 0,2~~

**~~Preparación:~~** ~~Suspender los ingredientes en un litro de agua. Calentar hasta su disolución completa, agitando frecuentemente. Ajustar el pH. Enfriar a 45°C y verter en cajas de petri estériles, distribuyendo de manera homogénea el precipitado propio del medio. El aspecto de las placas es opaco, de color verde pálido y deben usarse el mismo día de su preparación. Si la coloración es parda, no deben utilizarse. El medio no debe esterilizarse en autoclave; el sobrecalentamiento afecta su selectividad.~~

**~~B.14.2.1.3.3~~** ~~Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Xilosa~~ | ~~3,75g~~ |
| ~~L-lisina~~ | ~~5,00g~~ |
| ~~Lactosa~~ | ~~7,50g~~ |
| ~~Sacarosa~~ | ~~7,50g~~ |
| ~~Cloruro de sodio~~ | ~~5,00g~~ |
| ~~Extracto de levadura~~ | ~~3,00g~~ |
| ~~Rojo de fenol~~ | ~~0,08g~~ |
| ~~Agar~~ | ~~15,00g~~ |
| ~~Desoxicolato de sodio~~ | ~~2,50g~~ |
| ~~Citrato férrico-amónico~~ | ~~0,80g~~ |
| ~~Tiosulfato de sodio~~ | ~~6,80g~~ |
| ~~Agua destilada~~ | ~~1,00l~~ |

~~pH final: 6,9 ± 0,2~~

**~~Preparación:~~** ~~Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada, y calentar en baño de agua a 55°C, agitando frecuentemente, hasta disolución completa. Ajustar el pH. Enfriar a 50°C y verter en cajas de petri estériles. No se esterilice. El sobrecalentamiento produce una precipitación; la reactividad del medio puede ser satisfactoria, pero las colonias suelen ser muy pequeñas. El aspecto del medio es claro y de color rojo brillante.~~

**~~B.14.2.1.3.4~~** ~~Agar para Salmonella y Shigella (SS)~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Extracto de carne~~ | ~~5,000g~~ |
| ~~Polipeptona \*~~ | ~~5,000g~~ |
| ~~Lactosa~~ | ~~10,000g~~ |
| ~~Sales biliares~~ | ~~8,500g~~ |
| ~~Citrato de sodio dihidratado~~ | ~~8,500g~~ |
| ~~Tiosulfato de sodio pentahidratado~~ | ~~8,500g~~ |
| ~~Citrato férrico~~ | ~~1,000g~~ |
| ~~Agar~~ | ~~13,500g~~ |
| ~~Rojo neutro~~ | ~~0,025g~~ |
| ~~Verde brillante~~ | ~~0,330mg~~ |
| ~~Agua destilada~~ | ~~1,000l~~ |

~~pH final: 7,0 ± 0,2~~

~~\* La polipeptona se puede sustituir por 2,5 g de peptona de caseína y 2,5 g de peptona de carne.~~

**~~Preparación:~~** ~~Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada estéril y calentar a ebullición hasta disolución completa. Ajustar el pH. No esterilizar en autoclave. Enfriar a 50°C y distribuir en cajas de petri estériles en condiciones asépticas. El aspecto del medio fundido es claro y de color rosado.~~

**~~B.14.2.1.3.5~~** ~~Agar entérico Hektoen~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Proteosa peptona~~ | ~~12,000g~~ |
| ~~Extracto de levadura~~ | ~~3,000g~~ |
| ~~Lactosa~~ | ~~12,000g~~ |
| ~~Sacarosa~~ | ~~12,000g~~ |
| ~~Salicina~~ | ~~2,000g~~ |
| ~~Sales biliares~~ | ~~9,000g~~ |
| ~~Cloruro de sodio~~ | ~~5,000g~~ |
| ~~Tiosulfato de sodio~~ | ~~5,000g~~ |
| ~~Citrato amónico férrico~~ | ~~1,500g~~ |
| ~~Azul de bromotimol~~ | ~~0,064g~~ |
| ~~Fuscina ácida~~ | ~~0,100g~~ |
| ~~Agar~~ | ~~13,500g~~ |
| ~~Agua~~ | ~~1,000l~~ |

~~pH final: 7,5 ± 0,2~~

**~~Preparación:~~** ~~Suspender los ingredientes en agua destilada, hervir con agitación hasta completa disolución del agar. No sobrecalentar. Dejar enfriar a 55 - 60 °C y distribuir en cajas de petri estériles en condiciones asépticas.~~

**~~B.14.2.1.4 Medios para pruebas bioquímicas~~**

**~~B.14.2.1.4.1~~** ~~Agar de tres azúcares y hierro (TSI)~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Peptona de carne \*~~ | ~~1,0g~~ |
| ~~Peptona de caseína \*~~ | ~~1,0g~~ |
| ~~Cloruro de sodio~~ | ~~0,5g~~ |
| ~~Lactosa~~ | ~~1,0g~~ |
| ~~Sacarosa~~ | ~~1,0g~~ |
| ~~Glucosa~~ | ~~0,1g~~ |
| ~~Agar~~ | ~~1,3g~~ |
| ~~Rojo de fenol~~ | ~~2,5mg~~ |
| ~~Sulfato ferroso amónico-Pentahidratado~~ | ~~20,0mg~~ |
| ~~Tiosulfato de sodio~~ | ~~20,0mg~~ |
| ~~Agua destilada~~ | ~~100,0ml~~ |

~~pH final: 7,3 ± 0,2~~

~~\* Estas peptonas se pueden sustituir por 2 g de polipeptona.~~

**~~Preparación:~~** ~~Suspender los ingredientes en 100 ml de agua destilada. Calentar a ebullición, agitando ocasionalmente, hasta disolución completa. Enfriar a 60°C y ajustar el pH. Distribuir en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar a 121°C ± 1°C durante 15 min. Inclinar los tubos de manera que el medio de cultivo en el fondo alcance una altura de 3 cm y una profundidad de 4 cm. El medio es de color rojo.~~

**~~B.14.2.1.4.2~~** ~~Agar de hierro y lisina (LIA)~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Peptona de gelatina~~ | ~~0,5g~~ |
| ~~Extracto de levadura~~ | ~~0,3g~~ |
| ~~Glucosa~~ | ~~0,1g~~ |
| ~~L-lisina~~ | ~~1,0g~~ |
| ~~Citrato férrico-amónico~~ | ~~50,0mg~~ |
| ~~Tiosulfato de sodio anhidro~~ | ~~4,0mg~~ |
| ~~Púrpura de bromocresol~~ | ~~2,0mg~~ |
| ~~Agar~~ | ~~1,5g~~ |
| ~~Agua destilada~~ | ~~100,0ml~~ |

~~pH final: 6,7 ± 0,2~~

**~~Preparación:~~** ~~Suspender los ingredientes en el agua destilada y mezclar bien, calentar hasta ebullición con agitación frecuente hasta conseguir la disolución completa. Ajustar el pH. Distribuir en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm, con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave a 121°C ± 1°C durante 12 min. Dejar que los tubos se enfríen en posición inclinada, de tal modo que se obtengan columnas de medio de 4 cm y una superficie inclinada de 2 cm.~~

~~El medio ya preparado es de color púrpura.~~

**~~B.14.2.1.4.3~~** ~~Agar nutritivo~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Extracto de carne~~ | ~~3,0g~~ |
| ~~Peptona~~ | ~~5,0g~~ |
| ~~Agar~~ | ~~15,0g~~ |
| ~~Agua destilada~~ | ~~1,0l~~ |

~~pH final: 6,8 ± 0,2~~

**~~Preparación:~~** ~~Suspender los ingredientes en agua. Dejar reposar de 5 a 10 min. Calentar a ebullición hasta disolución completa. Distribuir en tubos de 13 x 100 mm, en cantidades de 1/3 de su volumen. Esterilizar a 121°C ± 1°C por 15 min. Inclinar los tubos antes que el agar solidifique.~~

**~~B.14.2.1.4.4~~** ~~Medio de SIM (para Sulfuro, Indol y Movilidad)~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Extracto de carne~~ | ~~3,000g~~ |
| ~~Peptona~~ | ~~30,000g~~ |
| ~~Hierro peatonizado~~ | ~~0,200g~~ |
| ~~Tiosulfato de sodio~~ | ~~0,025g~~ |
| ~~Agua destilada~~ | ~~1,000l~~ |

~~pH final: 7,3 ± 0,2~~

**~~Preparación:~~** ~~Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta lograr una disolución completa. Enfriar a 50°C y ajustar el pH. Distribuir el medio en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave a 121°C ± 1°C durante 15 min. Se dejan enfriar los tubos en posición vertical.~~

**~~B.14.2.1.4.5~~** ~~Agar citrato de Simmons~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Fosfato de amonio~~ | ~~1,00g~~ |
| ~~Fosfato dipotásico~~ | ~~1,00g~~ |
| ~~Cloruro de sodio~~ | ~~5,00g~~ |
| ~~Citrato de sodio~~ | ~~2,00g~~ |
| ~~Sulfato de magnesio~~ | ~~0,20g~~ |
| ~~Azul de bromotimol~~ | ~~0,08g~~ |
| ~~Agar~~ | ~~15,00g~~ |
| ~~Agua destilada~~ | ~~1,00l~~ |

~~pH final: 6,8 ± 0,2~~

**~~Preparación~~**~~: Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta lograr una disolución completa. Ajustar el pH. Distribuir el medio en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave a 121°C ± 1°C durante 15 min. Dejar enfriar los tubos en posición inclinada.~~

**~~B.14.2.1.4.6~~** ~~Caldo MR-VP (Rojo de metilo-Voges Proskauer)~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Peptona~~ | ~~7,0g~~ |
| ~~Dextrosa~~ | ~~5,0g~~ |
| ~~Difosfato de potasio~~ | ~~5,0g~~ |
| ~~Agua destilada~~ | ~~1,0l~~ |

~~pH final: 6,9 ± 0,2~~

**~~Preparación:~~** ~~Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta lograr una disolución completa. Ajustar el pH. Distribuir el medio en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave a 121°C ± 1°C durante 15 min.~~

**~~B.14.2.1.4.7~~** ~~Caldo manitol~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Extracto de carne~~ | ~~1,000g~~ |
| ~~Proteosa peptona~~ | ~~10,000g~~ |
| ~~Cloruro de sodio~~ | ~~5,000g~~ |
| ~~Rojo de fenol~~ | ~~0,018g~~ |
| ~~Manitol~~ | ~~10,000g~~ |
| ~~Agua~~ | ~~1,000 l~~ |

~~pH final: 7,4 ± 0,2~~

**~~Preparación:~~** ~~Suspender 26 g del medio deshidratado en un litro de agua, mezclar y ajustar el pH. Distribuir en volúmenes de 2 a 3 ml en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar a 121°C ± 1°C durante 15 min~~

**~~B.14.2.1.4.8~~** ~~Caldo malonato~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Extracto de levadura~~ | ~~1,000g~~ |
| ~~Sulfato de amonio~~ | ~~2,000g~~ |
| ~~Fosfato dipotásico~~ | ~~0,600g~~ |
| ~~Fosfato monopotásico~~ | ~~0,400g~~ |
| ~~Cloruro de sodio~~ | ~~2,000g~~ |
| ~~Malonato~~ | ~~3,000g~~ |
| ~~Glucosa~~ | ~~0,250g~~ |
| ~~Azul de bromotimol~~ | ~~0,025g~~ |
| ~~Agua~~ | ~~1,000l~~ |

~~pH final: 6,7 ± 0,2~~

**~~Preparación:~~** ~~Suspender los ingredientes en agua, mezclar y ajustar el pH. Distribuir en tubos de 13 x 100 mm en cantidades de 3 ml. Esterilizar en autoclave a 121°C ± 1°C durante 15 min.~~

**~~B.14.2.1.4.9~~** ~~Caldo Urea~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Urea~~ | ~~20,00g~~ |
| ~~Extracto de levadura~~ | ~~0,10g~~ |
| ~~Fosfato monopotásico~~ | ~~9,10g~~ |
| ~~Fosfato disódico~~ | ~~9,50g~~ |
| ~~Rojo de fenol~~ | ~~0,01g~~ |
| ~~Agua~~ | ~~1,00l~~ |

~~pH final: 6,8 ± 0,2~~

**~~Preparación:~~** ~~Disolver los ingredientes en agua destilada. NO CALENTAR. Esterilizar por filtración a través de membrana 0,45 µm o en autoclave de 5 a 8 lb de presión durante 15 min. Distribuir asépticamente de 1,5 a 3 ml en tubos estériles de 13 x 100 mm.~~

**~~B.14.2.1.4.10~~** ~~Caldo de urea rápido~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Urea~~ | ~~20,000g~~ |
| ~~Extracto de levadura~~ | ~~0,100g~~ |
| ~~Fosfato monopotásico~~ | ~~0,091g~~ |
| ~~Fosfato disódico~~ | ~~0,095g~~ |
| ~~Rojo de fenol~~ | ~~0,010g~~ |
| ~~Agua~~ | ~~1,000l~~ |

~~pH final: 6,8 ± 0,2~~

**~~Preparación:~~** ~~Disolver los ingredientes en agua destilada. NO CALENTAR. Esterilizar por filtración a través de membrana 0,45 µm. Distribuir asépticamente de 1,5 a 3 ml en tubos estériles de 13 x 100 mm.~~

**~~B.14.2.1.4.11~~** ~~Caldo infusión cerebro corazón~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Infusión cerebro corazón~~ | ~~200,0g~~ |
| ~~Infusión de corazón de res~~ | ~~250,0g~~ |
| ~~Proteosa peptona~~ | ~~10,0g~~ |
| ~~Cloruro de sodio~~ | ~~5,0g~~ |
| ~~Fosfato disódico dodecahidratado~~ | ~~2,5g~~ |
| ~~Dextrosa~~ | ~~2,0g~~ |
| ~~Agua destilada~~ | ~~1,0l~~ |

~~pH final: 7,4 ± 0,2~~

**~~Preparación:~~** ~~Disolver los ingredientes en agua destilada, calentar suavemente. Distribuir y esterilizar a 121°C ± 1°C durante 15 min.~~

**~~B.14.2.1.5 Soluciones~~**

**~~B.14.2.1.5.1~~** ~~Solución verde brillante al 0,1% (1:1000)~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Verde brillante~~ | ~~0,1g~~ |
| ~~Agua destilada estéril~~ | ~~100,0 ml~~ |

~~Disolver 0,1 g de verde brillante en agua destilada estéril hasta completar 100 ml.~~

**~~B.14.2.1.5.2~~** ~~Solución de yodo-yoduro~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Cristales de yodo~~ | ~~6,0g~~ |
| ~~Yoduro de potasio~~ | ~~6,0g~~ |
| ~~Agua destilada~~ | ~~100,0 ml~~ |

~~Disolver los cristales y el yoduro de potasio en agua destilada hasta completar 100 ml.~~

~~Conservar en frasco ámbar~~

**~~B.14.2.1.5.3~~** ~~Solución salina al 0,85%~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Cloruro de sodio~~ | ~~0,85g~~ |
| ~~Agua destilada~~ | ~~100,00ml~~ |

~~Disolver el cloruro de sodio en el agua y esterilizar a 121°C ± 1 °C durante 15 min.~~

**~~B.14.2.1.5.4~~** ~~Solución salina formalizada~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Solución de formaldehído (36-38%)~~ | ~~6,0ml~~ |
| ~~Cloruro de sodio~~ | ~~8,5g~~ |
| ~~Agua destilada~~ | ~~1,0l~~ |

~~Disolver 8,5 g de cloruro de sodio en 1 litro de agua destilada. Esterilizar a 121°C ± 1°C durante 15 min. Enfriar a temperatura ambiente. Adicionar 6 ml de la solución de formaldehído. No esterilizar después de la adición de formaldehído.~~

**~~B.14.2.1.5.5~~** ~~Reactivo de Kovac~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~p-dimetil-aminobenzaldehido~~ | ~~5,0g~~ |
| ~~Alcohol amílico~~ | ~~75,0ml~~ |
| ~~Acido clorhídrico concentrado~~ | ~~25,0ml~~ |

~~Disolver el p-dimetil-aminobenzaldehído en el alcohol amílico y después agregar el ácido clorhídrico lentamente. Conservar en frasco ámbar en refrigeración.~~

**~~B.14.2.1.5.6~~** ~~Solución de alfa-naftol al 5%~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Alfa-naftol~~ | ~~5,0g~~ |
| ~~Alcohol~~ | ~~100,0 ml~~ |

~~Disolver 5 g de alfa-naftol en alcohol hasta completar 100 ml.~~

**~~B.14.2.1.5.7~~** ~~Solución de rojo de metilo~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Rojo de metilo~~ | ~~0,10g~~ |
| ~~Alcohol etílico~~ | ~~300,00ml~~ |
| ~~agua destilada c.b.p~~ | ~~500,00ml~~ |

~~Disolver el rojo de metilo en el alcohol etílico y adicionar agua hasta completar 500 ml.~~

**~~B.14.2.1.5.8~~** ~~Solución de hidróxido de potasio al 40%~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Hidróxido de potasio~~ | ~~40,0g~~ |
| ~~Agua destilada~~ | ~~100,0 ml~~ |

~~Disolver 40 g de hidróxido de potasio en agua hasta completar 100 ml.~~

**~~B.14.2.1.5.9~~** ~~Solución de gelatinasa al 5%~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~FORMULA~~** | |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidades~~** |
| ~~Gelatinasa~~ | ~~5,0g~~ |
| ~~Agua~~ | ~~100,0 ml~~ |

~~Disolver 5 g de gelatinasa en 100 ml de agua destilada. NO CALENTAR.~~

**~~B. 14.2.1.6 Antisueros~~**

~~Antisuero polivalente somático (O)~~

~~Antisuero polivalente flagelar (H)~~

~~Antisuero Vi~~

**~~B.14.2.2 Material~~**

~~Matraces Erlenmeyer de 500 ml~~

~~Recipientes de boca ancha, de capacidad apropiada para contener las muestras simples y compuestas~~

~~Angulos de vidrio~~

~~Cucharas, bisturíes, cuchillos y pinzas~~

~~Tubos de ensaye de 16 x 150 mm y de 20 x 100 mm~~

~~Tubos para serología de 10 x 75 mm o de 13 x 100 mm~~

~~Pipetas bacteriológicas de 10,0 y 5,0 ml, graduadas en 0,1 ml y protegidas con tapón de algodón.~~

~~Pipetas de 1 ml, con graduaciones de 0,01 ml~~

~~Cajas de Petri estériles de vidrio o desechables~~

~~Rejillas para tubos de ensaye~~

~~Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro~~

~~Papel pH (intervalo de 6-8) con graduaciones máximas de 0,4 unidades de pH para cambios de color~~

~~Todo el material que tenga contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse mediante:~~

~~Horno, durante 2 horas a 170-175°C o autoclave, durante 15 min como mínimo a 121°C ± 1°C~~

**~~B.14.3 Equipo~~**

~~Horno para esterilizar que alcance los 180 °C~~

~~Incubadora con termostato para evitar variaciones mayores de ± 0,1°C y termómetro.~~

~~Autoclave con termómetro o manómetro, probado con termómetro de máximas.~~

~~Baño maría con termostato y termómetro.~~

~~Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g~~

~~Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato, con vasos esterilizables (vidrio o aluminio).~~

~~Mecheros Bunsen o Fisher~~

~~Potenciómetro~~

**~~B.14.4 Procedimiento~~**

**~~B.14.4.1~~** ~~Preparación de los alimentos para el aislamiento de~~ *~~Salmonella~~*

~~Los siguientes métodos se basan en el análisis de 25 g de la muestra analítica en una proporción de 1:9 de muestra/ caldo. Esta cantidad puede variarse siempre que se mantenga la misma proporción. Se recomienda una muestra de 25 g o más.~~

**~~B.14.4.1.1~~** ~~Procedimiento general para la preparación de muestras~~

~~Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un vaso estéril de licuadora o en bolsa estéril para trabajar en homogeneizador peristáltico (stomacher). Adicionar 225 ml del medio de preenriquecimiento estéril (generalmente caldo lactosado, a menos que se indique otro) y licuar si es necesario durante un min. Transferir asépticamente la mezcla homogeneizada a un recipiente estéril de boca ancha con tapón de rosca y dejar reposar por 60 min a temperatura ambiente con la tapa bien enroscada. Mezclar bien y determinar el pH aproximado con papel pH. Ajustar, si es necesario, a un pH 6,8 ± 0,2 con hidróxido de sodio 1N o ácido clorhídrico 1N estériles. Mezclar y cubrir el recipiente enroscando suavemente la tapa.~~

~~Incubar 24 ± 2 h a 35 °C. Continuar como se indica en B.14.4.2.1~~

**~~B.14.4.1.2~~** ~~Procedimiento específico para la preparación~~

**~~B.14.4.1.2.1~~** ~~Productos que contienen huevo en su formulación (pastas para sopa, rollos chinos, etc.); ensaladas preparadas (jamón, huevos, pollo, atún, pavo); frutas frescas, congeladas o secas; crustáceos (camarones, cangrejos, jaibas, langostinos, langostas) y pescado.~~

~~Preferentemente no descongelar la muestra antes de su análisis, si esto es necesario, utilizar caldo lactosado como medio de preenriquecimiento, licuar dos min. Continuar después de la incubación como en B.14.4.2.1~~

**~~B.14.4.1.2.2~~** ~~Carnes, sustitutos de carnes, derivados cárnicos, sustancias de origen animal, productos glandulares y harinas (pescado, carne y hueso).~~

**~~B.14.4.1.2.2.1~~** ~~Productos procesados térmicamente y productos secos. Se sigue el procedimiento señalado en A.13.4.1.1 hasta la homogenización. Si la muestra es en polvo o molida, el licuado puede omitirse. Después de reposar, mezclar bien y ajustar el pH como se indica en el procedimiento general. Para emulsionar las grasas, agregar los detergentes en las mismas proporciones y con las mismas recomendaciones que para el coco. La cantidad de los mismos dependerá en gran medida de la composición del alimento. Los detergentes no serán necesarios en los productos glandulares en polvo. Incubar las muestras como se indica en B.14.4.1.1.~~

**~~B.14.4.1.2.2.2~~** ~~Productos crudos o altamente contaminados. Pesar porciones de 25 g de producto en dos vasos para licuadora. Si la muestra es en polvo o molida, el licuado puede omitirse y el producto puede pesarse directamente en matraces Erlenmeyer estériles de 500 ml. Adicionar 225 ml de caldo selenito cistina o 225 ml de caldo tetrationato (sin verde brillante) a cada muestra analítica. Licuar por dos min y pasar asépticamente a matraces Erlenmeyer de 500 ml. Dejar reposar y ajustar el pH como se indica en B.14.4.1.1~~

~~Adicionar 2,25 ml de solución de verde brillante 0,1% y 4,5 ml de solución yodo-yoduro a la muestra que se enriquecerá con caldo tetrationato. Homogenizar e incubar. Continuar como se indica en B.13.4.2.1~~

**~~B.14.4.2~~** ~~Aislamiento de~~ *~~Salmonella~~*

**~~B.14.4.2.1~~** ~~Cerrar firmemente el tapón de rosca de los matraces con los cultivos de preenriquecimiento y agitar suavemente, transferir respectivamente 1 ml de la mezcla a un tubo que contenga 10 ml de caldo tetrationato y a otro con 10 ml de caldo selenito cistina. Como alternativa, en sustitución del caldo tetrationato puede emplearse el medio Vassiliadis-Rappaport.~~

**~~B.14.4.2.2~~** ~~Incubar de 18 a 24 h a 35°C o, para alimentos fuertemente contaminados a 42°C por el mismo período. Estriar los productos que fueron directamente enriquecidos en medios selectivos.~~

**~~B.14.4.2.3~~** ~~Mezclar el tubo con caldo selenito cistina y estriar en agar xilosa lisina desoxicolato (XLD), agar verde brillante (VB) y una tercera caja con cualquiera de los medios selectivos adicionales (agar entérico Hektoen, agar Sulfito de Bismuto o Agar SS).~~

~~Efectuar el mismo procedimiento para el caldo tetrationato.~~

~~Incubar las placas 24 ± 2 h a 35°C.~~

**~~B.14.4.2.4~~** ~~Examinar las placas para investigar la presencia de colonias típicas de~~ *~~Salmonella,~~* ~~de acuerdo con las siguientes características:~~

~~Agar XLD: colonias rosas o rojas que pueden ser transparentes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.~~

~~Agar VB: colonias rojas o rosas que pueden ser transparentes rodeadas por medio enrojecido; las bacterias fermentadoras de la lactosa dan colonias amarillas.~~

~~Agar entérico Hektoen: colonias verdes o azulverdes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.~~

~~Agar Sulfito de Bismuto: las colonias típicas de~~ *~~Salmonella~~* ~~pueden ser cafés, grises o negras; con o sin brillo metálico. Generalmente el medio circundante (halo) es café, tornándose posteriormente negro. Algunas cepas producen colonias verdes sin la formación del halo oscuro. Si las placas no muestran colonias típicas o no se observa crecimiento, incubar 24 h adicionales.~~

~~Agar SS: colonias translúcidas, ocasionalmente opacas. Algunas colonias dan centro negro. Las colonias fermentadoras de la lactosa son rojas.~~

**~~B.14.4.3~~** ~~Identificación bioquímica~~

**~~B.14.4.3.1~~** ~~Seleccionar al menos dos colonias típicas de cada medio selectivo, que se encuentren bien aisladas.~~

~~Tocar levemente el centro de cada colonia e inocular dos tubos, uno con agar triple azúcar hierro (TSI) y otro con agar hierro lisina (LIA), por estría en la superficie inclinada y por punción en el fondo.~~

~~Incubar por 24 ± 2 h a 35°C.~~

~~Almacenar en refrigeración de 5 a 8 °C las placas con medios selectivos por sí es necesario retomar más colonias.~~

**~~B.14.4.3.2~~** ~~Observar el crecimiento en los tubos y considerar presuntivamente positivas para~~ *~~Salmonella~~* ~~las colonias que den las siguientes reacciones:~~

**~~B.14.4.3.2.1~~** ~~Agar TSI, en el fondo del tubo se observa vire del indicador debido a la fermentación de la glucosa; en la superficie del medio se observa un color rojo más intenso que el medio original debido a la no fermentación de la lactosa ni de la sacarosa. En la mayoría de los casos se observa coloración negra a lo largo de la punción debido a la producción de ácido sulfihídrico.~~

**~~B.14.4.3.2.2~~** ~~Agar LIA, se observa intensificación del color púrpura en todo el tubo por la descarboxilación de la lisina. Considerar negativos aquellos cultivos que produzcan claramente color amarillo en el fondo del agar. La mayoría de las cepas de~~ *~~Salmonella~~* ~~producen ácido sulfihídrico en este medio con ennegrecimiento a lo largo de la punción.~~

**~~B.14.4.3.2.3~~** ~~Retener todos los cultivos que muestren las reacciones características de~~ *~~Salmonella~~* ~~en los medios TSI y LIA para las pruebas adicionales, indicadas en B.14.4.3.3~~

**~~B.14.4.3.3~~** ~~Los cultivos con TSI que no parecen de Salmonella pero que presentan reacciones en LIA típicos, deben trabajarse como cultivos presuntivos positivos, ya que en estos casos, el medio LIA permitirá detectar~~ *~~S. arizonae~~* ~~y cepas atípicas de~~ *~~Salmonella~~* ~~que utilicen lactosa o sacarosa. Descartar solamente los cultivos que muestren reacciones atípicas en ambos medios.~~

**~~B.14.4.3.4~~** ~~Continuar el análisis a partir de los tubos de TSI con reacciones típicas. Si el cultivo presenta reacciones atípicas en este medio, tomar colonias adicionales de las placas de donde se obtuvo el cultivo atípico anterior y sembrar las pruebas bioquímicas nuevamente.~~

**~~B.14.4.3.5~~** ~~Continuar la identificación bioquímica y serológica a partir de los cultivos recuperados de TSI. Se recomienda trabajar seis cultivos por cada 25 g de unidad analítica seleccionando colonias procedentes de ambos medios de enriquecimiento.~~

**~~B.14.4.3.6~~** ~~Prueba de ureasa~~

**~~B.14.4.3.6.1~~** ~~Prueba de ureasa (convencional). Con una asa estéril, tomar crecimiento del cultivo presumiblemente positivo de cada tubo de medio TSI e inocular tubos de caldo urea. Utilizar un control de medio para comparar el vire púrpura de las reacciones positivas con el color del medio original. Incubar 24 ± 2 h a 35 °C.~~

**~~B.14.4.3.6.2~~** ~~Prueba de ureasa (rápida). Tomar dos asadas de crecimiento del cultivo presumiblemente positivo de cada tubo de medio TSI e inocular tubos de caldo urea (rápida). Incubar 2 h a 37 ± 0,5°C en baño de agua.~~

~~Descartar todos los cultivos que den ureasa positiva. Retener los cultivos que den la prueba negativa (sin cambio de color del medio).~~

**~~B.14.4.4~~** ~~Identificación serológica~~

**~~B.14.4.4.1~~** ~~Ensayo de los antígenos somáticos de~~ *~~Salmonella~~* ~~(Antisuero polivalente O).~~

**~~B.14.4.4.1.1~~** ~~Colocar con una asa dos gotas separadas de solución salina estéril sobre un portaobjetos o en dos secciones de una placa para aglutinación. Suspender en cada una de las gotas, una porción del cultivo desarrollado en TSI.~~

**~~B.14.4.4.1.2~~** ~~Agregar a una de ellas una gota del antisuero polivalente somático (O) y mezclar con el canto del asa o empleando aplicadores de madera.~~

**~~B.14.4.4.1.3~~** ~~Agitar inclinando la lámina hacia atrás y hacia adelante durante aproximadamente un min. Observar bajo buena iluminación sobre un fondo oscuro.~~

**~~B.14.4.4.1.4~~** ~~Considerar cualquier grado de aglutinación como positiva.~~

~~La prueba positiva resulta cuando se presenta aglutinación en la gota con el cultivo y el antisuero y no aglutinación en la gota que contiene el cultivo y la solución salina.~~

~~Si se observa aglutinación en ambas gotas, la prueba no es definitiva y se debe continuar con las pruebas bioquímicas complementarias.~~

**~~B.14.4.4.2~~** ~~Cuando la aglutinación es positiva con el suero polivalente O, puede determinarse el subgrupo empleando antisueros para los diferentes subgrupos (los grupos B, C, D y E, suelen ser los más frecuentes).~~

**~~B.14.4.4.2.1~~** ~~Si la aglutinación con el antisuero O es negativa, utilizar antisuero Vi y efectuar la prueba. Si hay aglutinación con Vi calentar el cultivo a ebullición y repetir la aglutinación con el antisuero polivalente O.~~

**~~B.14.4.4.2.2~~** ~~Si no se cuenta con los sueros grupoespecíficos, solicitar la tipificación de la cepa al Laboratorio de Enterobacterias del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia de la Secretaría de Salud o al Laboratorio Nacional de Salud Pública.~~

**~~B.14.4.4.3~~** ~~Si se requiere, practicar el ensayo de los antígenos flagelares de~~ *~~Salmonella~~* ~~(Antisuero polivalente H).~~

**~~B.14.4.4.3.1~~** ~~Inocular el crecimiento del tubo de TSI en agar infusión de cerebro corazón e incubar de 4 a 6 h a 35 °C hasta que se observe crecimiento (para ensayo en el mismo día), o bien, en caldo soya tripticaseina e incubar por 24 ± 2 h a 35°C (para ensayo al día siguiente). Adicionar 2,5 ml de solución salina formalizada a 5 ml del cultivo en caldo o al cultivo en agar cerebro corazón (BHI).~~

**~~B.14.4.4.3.2~~** ~~Colocar 0,5 ml del antisuero polivalente flagelar (H) preparado en un tubo para serología (13 x 100 mm aproximadamente). Adicionar 0,5 ml del cultivo formalizado. Preparar un control de solución salina mezclando 0,5 ml de solución salina formalizada con 0,5 ml del antígeno formalizado. Incubar las mezclas en baño de agua a 48- 50°C. Observar a intervalos de 15 min por espacio de una h. Una prueba positiva es cuando se observa aglutinación en la mezcla de prueba pero no en el control. Debe interpretarse como negativa una prueba en la que ninguna de las mezclas muestre aglutinación. Cuando ambas mezclas se aglutinan, se considera la prueba inespecífica.~~

**~~B.14.4.5~~** ~~Pruebas bioquímicas complementarias~~

~~Cuando las pruebas serológicas o bioquímicas iniciales, dan resultados atípicos o no concluyentes, realizar las pruebas que se describen a continuación:~~

**~~B.14.4.5.1~~** ~~Inocular los cultivos positivos provenientes de TSI y LIA en: medio SIM, agar citrato de Simmons, caldo manitol y caldo RM-VP. Usar caldo malonato para confirmar la presencia de la especie~~ *~~S. arizonae.~~*

**~~B.14.4.5.2~~** ~~Interpretar los cambios en los medios inoculados conforme lo siguiente:~~

**~~B.14.4.5.2.1~~** ~~Agar citrato Simmons~~

~~Inocular por estría el tubo~~

~~Incubar 96 ± 2 h a 35 ± 2°C~~

~~Prueba positiva: crecimiento acompañado de un cambio de color de verde a azul.~~

~~Prueba negativa: ausencia de crecimiento y sin cambio de color.~~

**~~B.14.4.5.2.2~~** ~~Medio SIM~~

~~Inocular por punción~~

~~Incubar 24 h a 35 ± 2°C~~

~~Movilidad~~

~~Prueba positiva: crecimiento a lo largo de la punción y en el seno del medio de cultivo.~~

~~Prueba negativa: crecimiento a lo largo de la punción exclusivamente.~~

~~Producción de ácido sulfihídrico~~

~~Prueba positiva: desarrollo de un color negro a lo largo de la punción que puede extenderse a todo el medio.~~

~~Prueba negativa: ausencia de color negro.~~

~~Producción de indol~~

~~Adicionar al tubo con medio SIM que presente crecimiento, de 0,2 a 0,3 ml de reactivo de Kovac.~~

~~Prueba positiva: desarrollo de un anillo de color rojo.~~

~~Prueba negativa: sin cambio de color.~~

**~~B.14.4.5.2.3~~** ~~Caldo RM-VP~~

~~Inocular un tubo con el medio~~

~~Incubar 48 ± 2 h a 35 ± 2°C para la prueba de VP y 96 h para la prueba RM~~

**~~B.14.4.5.2.3.1~~** ~~Prueba de Voges-Proskauer (VP)~~

~~Transferir a un tubo un ml del cultivo de 48 h~~

~~Adicionar 0,6 ml de solución de alfa naftol~~

~~Adicionar 0,2 ml de solución de hidróxido de potasio 40%~~

~~Adicionar algunos cristales de creatinina (opcional)~~

~~Interpretar los resultados después de incubar 2 h a 35 ± 2°C o 4 h a temperatura ambiente~~

~~Prueba positiva: desarrollo de color rojo ladrillo~~

~~Prueba negativa: sin cambio de color~~

~~Reincubar el resto del medio RM-VP 48 h más a 35 ± 2°C~~

**~~B.14.4.5.2.3.2~~** ~~Prueba de rojo de metilo (RM)~~

~~Adicionar al medio de cultivo de 96 h de incubación de dos a tres gotas de solución de rojo de metilo~~

~~Interpretar los resultados inmediatamente~~

~~Prueba positiva: desarrollo de color rojo~~

~~Prueba negativa: desarrollo de color amarillo~~

**~~B.14.4.5.2.4~~** ~~Caldo malonato~~

~~Inocular un tubo conteniendo el medio~~

~~Incubar 40 ± 2 h a 35 ± 2°C~~

~~Prueba positiva: desarrollo de color azul~~

~~Prueba negativa: sin cambio de color~~

**~~B.14.4.5.2.5~~** ~~Caldo manitol~~

~~Inocular un tubo conteniendo el medio~~

~~Incubar 24 ± 2 h a 35 ± 2°C~~

~~Prueba positiva: desarrollo de color amarillo~~

~~Prueba negativa: sin cambio de color~~

**~~B.14.4.5.3~~** ~~Consultar los resultados obtenidos en el cuadro 2 para la identificación de los géneros de las bacterias investigadas.~~

**~~Nota~~**~~: Los sistemas bioquímicos comerciales validados pueden ser usados como alternativa para las pruebas bioquímicas convencionales.~~

**~~B.14.5 Cálculo y expresión de resultados~~**

**~~B.14.5.1~~** ~~Interpretación de reacciones bioquímicas y serológicas.~~

**~~CUADRO 1~~**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **~~Reacciones bioquImicas~~** | **~~Reacciones serolOgicas~~** | **~~InterpretaciOn~~** |
| ~~Típica~~ | ~~Antígeno O, Vi o H positivo~~ | ~~Cepas consideradas como~~ *~~Salmonella~~* |
| ~~Típica~~ | ~~Todas las reacciones negativas~~ |  |
| ~~Típica~~ | ~~No probada~~ | ~~Puede ser~~ *~~Salmonella~~* |
| ~~Reacciones atípicas~~ | ~~Antígeno O, Vi o H positivo~~ |  |
| ~~Reacciones atípicas~~ | ~~Todas las reacciones negativas~~ | ~~No debe ser considerada~~ *~~Salmonella~~* |

**~~B.14.5.2~~** ~~Reacciones bioquímicas y serológicas de~~ *~~Salmonella~~*

**~~CUADRO 2~~**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **~~Prueba o sustrato~~** | **~~Positivo~~** | **~~Negativo~~** | **~~ReacciOn~~** |
| ~~Glucosa (TSI)~~ | ~~amarillo~~ | ~~rojo~~ | ~~+~~ |
| ~~Lisina descarboxilasa(LIA)~~ | ~~púrpura~~ | ~~amarillo~~ | ~~+~~ |
| ~~H~~~~2~~~~S (TSI y LIA)~~ | ~~negro~~ | ~~no negro~~ | ~~+~~ |
| ~~Ureasa~~ | ~~rojo-púrpura~~ | ~~no hay cambio de color~~ | ~~-~~ |
| ~~Caldo de lisina descarboxilasa~~ | ~~púrpura~~ | ~~amarillo~~ | ~~+~~ |
| ~~Caldo dulcitol rojo de fenol~~ | ~~³ amarillo o gas~~ | ~~no hay ³ cambio de color, ni gas~~ | ~~+~~~~b~~ |
| ~~Caldo KCN~~ | ~~crecimiento~~ | ~~no hay crecimiento~~ | ~~-~~ |
| ~~Caldo malonato~~ | ~~azul~~ | ~~no hay cambio de color~~ | ~~-~~ |
| ~~Prueba de indol~~ | ~~superficie color violeta~~ | ~~superficie color amarillo~~ | ~~-~~ |
| ~~Prueba del antígeno flagelar~~ | ~~aglutinación~~ | ~~no hay aglutinación~~ | ~~+~~ |
| ~~Prueba del antígeno somático~~ | ~~aglutinación~~ | ~~no hay aglutinación~~ | ~~+~~ |
| ~~Caldo lactosa rojo fenol~~ | ~~amarillo o gas~~ | ~~no hay cambio de color, ni gas~~ | ~~-~~ |
| ~~Caldo sacarosa rojo fenol~~ | ~~amarillo o gas~~ | ~~no hay cambio de color, ni gas~~ | ~~-~~ |
| ~~Prueba Voges- Proskauer~~ | ~~de rosa a rojo~~ | ~~no hay cambio de color~~ | ~~-~~ |
| ~~Prueba rojo de metilo~~ | ~~rojo difuso~~ | ~~amarillo difuso~~ | ~~+~~ |
| ~~Citrato de Simmons~~ | ~~crecimiento color azul~~ | ~~no hay crecimiento no hay cambio de color~~ | ~~v~~ |

~~a~~ ~~+, 90 % o más positivos en 1 o 2 días; -, 90 % o más negativas en 1 o 2 días; v, variable.~~

~~b~~ ~~La mayoría de los cultivos S. arizonae son negativos.~~

~~c~~ ~~La mayoría de los cultivos S. arizonae son positivos.~~

**~~B.14.5.3~~****~~Informe de Resultados~~**

~~Informar: presencia o ausencia de Salmonella en \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ g o \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ ml de muestra.~~

**B.15. METODO PARA LA DETERMINACION DE** *Staphylococcus aureus* **EN ALIMENTOS. (Este Capítulo quedará sin efectos a los 360 días naturales siguientes a la entrada en vigor de la NOM-210-SSA1-2014, Art. Tercero Transitorio de la mencionada NOM publicada el 26/VI/2015).**

**~~B.15.1~~****~~Fundamento~~**

~~Este método permite hacer una estimación del contenido de Staphylococcus aureus en alimentos, se efectúa directamente en placas de medio de cultivo selectivo y diferencial, con la confirmación mediante las pruebas de coagulasa y termonucleasa. Este método es adecuado para el análisis de alimentos en los cuales se esperen más de 100 células de~~ *~~Staphylococcus aureus~~* ~~por g.~~

**~~B.15.2 Reactivos y materiales~~**

~~En caso de disponerse de fórmulas comerciales deshidratadas, para su preparación se deben seguir las instrucciones impresas en la etiqueta respectiva.~~

~~Cuando se mencione agua debe entenderse que se trata de "agua destilada".~~

~~Los reactivos a emplear en el método objeto de esta norma deben ser grado analítico.~~

**~~B.15.2.1~~****~~Reactivos~~**

**~~B.15.2.1.1~~** ~~Soluciones diluyentes~~

**~~B.15.2.1.1.1~~** ~~Solución reguladora de fosfatos (Solución concentrada)~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Fosfato monopotásico~~ | ~~34,0 g~~ |
| ~~Agua~~ | ~~1,0 l~~ |

**~~Preparación:~~** ~~Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1 N, aforar con agua a 1 l. Esterilizar durante 15 min a 121ºC ±1, conservar en refrigeración (solución concentrada). Tomar 1,25 ml de la solución concentrada y llevar a 1 l con agua (solución de trabajo). Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera. Esterilizar a 121ºC ±1 durante 15 min. Después de la esterilización, los volúmenes finales y el pH de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.~~

**~~B.15.2.1.1.2~~** ~~Agua peptonada~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Peptona~~ | ~~1,0 g~~ |
| ~~Cloruro de sodio~~ | ~~8,5 g~~ |
| ~~Agua~~ | ~~1,0 l~~ |

**~~Preparación:~~** ~~Disolver los componentes en un litro de agua. Ajustar el pH a 7,0 con solución de hidróxido de sodio 1N. Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera. Esterilizar a 121ºC ±1 durante 15 min. Después de la esterilización los volúmenes finales y el pH de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.~~

**~~B.15.2.1.2~~****~~Medios de cultivo~~**

**~~B.15.2.1.2.1~~** ~~Medio de Baird-Parker~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Medio base (6.1.2.1.1)~~ | ~~95,0 ml~~ |
| ~~Solución de telurito de potasio (6.1.2.1.2)~~ | ~~1,0 ml~~ |
| ~~Emulsión de yema de huevo (6.1.2.1.3)~~ | ~~5,0 ml~~ |

**~~Preparación:~~** ~~Cuando el medio base esté a 45ºC, agregar los demás ingredientes y mezclar. Colocar de 15 a 20 ml del medio completo, enfriar y dejar solidificar. Las placas pueden almacenarse por 48 h a temperatura de 0 a 5ºC.~~

**~~B.15.2.1.2.1.1.~~** ~~Medio base de Baird-Parker~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Triptona~~ | ~~10,0 g~~ |
| ~~Extracto de levadura~~ | ~~1,0 g~~ |
| ~~Extracto de carne~~ | ~~5,0 g~~ |
| ~~Glicina~~ | ~~12,0 g~~ |
| ~~Cloruro de litio~~ | ~~5,0 g~~ |
| ~~Piruvato de sodio~~ | ~~10,0 g~~ |
| ~~Agar~~ | ~~20,0 g~~ |
| ~~Agua~~ | ~~1,0 l~~ |

**~~Preparación:~~** ~~Disolver los ingredientes o el agar base en agua y calentar con agitación constante y hervir durante 1 min. Esterilizar a 121ºC ±1 durante 15 min. Enfriar y mantener el medio a 45ºC.~~

**~~B.15.2.1.2.1.2~~** ~~Solución de telurito~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Telurito de potasio~~ | ~~1,0 g~~ |
| ~~Agua~~ | ~~100,0 ml~~ |

**~~Preparación:~~** ~~Disolver el telurito de potasio en agua y esterilizar. La solución puede ser almacenada por varios meses a temperatura de 0 a 5ºC.~~

**~~B.15.2.1.2.1.3~~** ~~Emulsión de yema de huevo~~

**~~Preparación.~~** ~~Lavar con agua y jabón los huevos frescos que sean necesarios y limpiarlos con una solución de tintura de yodo (solución alcohólica al 2%) o sumergirlos en solución de cloruro mercúrico (1:1000). Enjuagar con agua estéril y secar con gasa estéril. En campana de flujo laminar o en condiciones asépticas, abrir los huevos y vaciarlos en un separador de claras estéril. Transferir las yemas a una probeta hasta un volumen de 60 ml y completar a 90 ml con solución salina isotónica. Verter la emulsión a un matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio estéril y agitar fuertemente para formar la emulsión. Filtrar a través de gasa. Las placas deben utilizarse dentro de las 48 h siguientes a su preparación.~~

**~~B.15.2.1.2.1.4~~** ~~Solución salina isotónica~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Cloruro de sodio~~ | ~~0,85 g~~ |
| ~~Agua~~ | ~~100,0 ml~~ |

**~~Preparación:~~** ~~Disolver el ingrediente en agua y esterilizar a 121ºC ±1 durante 15 min.~~

**~~B.15.2.1.2.2~~** ~~Caldo de infusión cerebro-corazón (BHI)~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Infusión de cerebro de ternera~~ | ~~200,0 ml~~ |
| ~~Infusión de corazón de res~~ | ~~250,0 ml~~ |
| ~~Peptona de gelatina~~ | ~~10,0 g~~ |
| ~~Cloruro de sodio~~ | ~~5,0 g~~ |
| ~~Fosfato disódico dodecahidratado~~ | ~~2,5 g~~ |
| ~~Glucosa~~ | ~~2,0 g~~ |
| ~~Agua~~ | ~~1,0 l~~ |

**~~Preparación:~~** ~~Disolver los ingredientes en agua y calentar ligeramente si es necesario. Distribuir y esterilizar durante 15 min a 121ºC ±1.~~

**~~B.15.2.1.2.3~~** ~~Acido desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera.~~

**~~FORMULA~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Acido desoxirribonucleico helicoi-dal de timo de ternera o equivalente~~ | ~~0,03 g~~ |
| ~~Agar~~ | ~~1,00 g~~ |
| ~~Cloruro de calcio anhidro (Solución 0,01 M) (A.7.1.2.3.1)~~ | ~~0,10 ml~~ |
| ~~Cloruro de sodio~~ | ~~1,00 g~~ |
| ~~Azul de toluidina (Solución 0,1 M) (6.1.2.3.2)~~ | ~~0,30 ml~~ |
| ~~Tris-(hidroximetil-aminometano) (Tris solución 0,05 M, pH 9) (A.7.1.2.3.3)~~ | ~~100,00 ml~~ |

**~~Preparación~~**~~: Disolver los ingredientes, excepto el azul de toluidina agitando hasta completar la disolución del ácido desoxirribonucleico y calentar a ebullición. Agregar el azul de toluidina. Distribuir en frascos pequeños con tapón de hule. No es necesario esterilizar. Este medio es estable a temperatura ambiente hasta 4 meses y funciona perfectamente aun después de fundirlo varias veces. Tomar un porta objetos limpio y agregar 3 ml del medio fundido esparciéndolo por la superficie. Cuando el agar solidifique, hacer orificios con la punta de una pipeta Pasteur. Conservar en refrigeración para evitar la deshidratación.~~

**~~B.15.2.1.2.3.1~~** ~~Solución de cloruro de calcio anhidro 0,01 M~~

~~Cloruro de calcio PM = 110,99~~

~~Disolver 0,1199 g de cloruro de calcio en 100 ml de agua.~~

**~~B.15.2.1.2.3.2~~** ~~Solución de azul de toluidina 0,1 M~~

~~Disolver 3,05 g de azul de toluidina en 100 ml de agua.~~

**~~B.15.2.1.2.3.3~~** ~~Solución amortiguadora 0,05 M Tris-(hidroximetilaminometano)~~

~~(Tris pH 9) PM = 121,1~~

~~Disolver 6,055 g de Tris en 100 ml de agua.~~

**~~B.15.2.1.3~~** ~~Reactivo biológico:~~

~~Plasma de conejo~~

~~Emplear plasma de conejo deshidratado o rehidratado siguiendo las instrucciones del fabricante y agregar ácido etilendiaminotetracético (EDTA) en solución al 0,1% en plasma rehidratado. Si se utiliza plasma deshidratado diluir con agua estéril en proporción de 1:3. Puede emplearse plasma de conejo liofilizado adicionado de EDTA. No debe emplearse sangre citratada.~~

**~~B.15.2.2~~****~~Materiales~~**

~~Todos los instrumentos que se utilicen para trabajar la muestra deben esterilizarse mediante horno, durante 2 h de 170-175ºC o como alternativa en autoclave durante 15 min como mínimo a 121ºC ±1.~~

~~Cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas y separador de huevo.~~

~~Tubos de cultivo de 16 mm x 150 mm o frascos de 125 a 250 ml de capacidad.~~

~~Tubos de cultivo de 10 mm x 75 mm.~~

~~Cajas Petri de 90 a 100 mm de diámetro.~~

~~Pipetas bacteriológicas de 1 ml y 10 ml de capacidad graduadas en 0,1 ml y 1 ml respectivamente y diámetro de 2 a 3 mm.~~

~~Pipetas Pasteur.~~

~~Probetas.~~

~~Varillas de vidrio de 3,5 mm de diámetro aproximadamente y 20 cm de largo dobladas en ángulo recto.~~

~~Matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio~~

~~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.15.3 Aparatos~~**

~~Horno para esterilizar que alcance 180°C.~~

~~Autoclave con termómetro.~~

~~Baño de agua con regulador de temperatura de 35 ± 0,5ºC.~~

~~Baño de agua con regulador de temperatura de 45 ± 0,5ºC.~~

~~Balanza con capacidad no mayor de 2,500 g y sensibilidad de 0,1 g.~~

~~Incubadora a 35 ± 1ºC.~~

**~~B.15.4 Preparación de la muestra~~**

~~La preparación de la muestra se debe realizar de acuerdo a lo establecido en el método Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.~~

**~~B.15.5 Procedimiento~~**

**~~B.15.5.1~~** ~~Utilizando diferentes pipetas de 1 ml para cada dilución, depositar 0,1 ml sobre la superficie de las placas de agar Baird-Parker.~~

**~~B.15.5.2~~** ~~Distribuir el inóculo sobre la superficie del agar con varillas estériles de vidrio en ángulo recto, utilizando una para cada dilución.~~

**~~B.15.5.3~~** ~~Mantener las placas en su posición hasta que el inóculo sea absorbido por el agar.~~

**~~B.15.5.4~~** ~~Invertir las placas e incubar de 45 a 48 h a 35ºC.~~

**~~B.15.5.5~~** ~~Seleccionar las placas que tengan entre 15 y 150 colonias típicas de~~ *~~Staphylococcus aureus~~*~~; si no es posible, seleccionar las placas de las diluciones más altas no obstante tengan más de 150 colonias.~~

**~~B.15.5.6~~** ~~Cuando las placas tengan menos de 15 colonias típicas también pueden ser utilizadas y al informe se debe agregar la nota de "valor estimado".~~

**~~B.15.5.7~~** ~~Las colonias típicas son negras, circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1 a 2 mm y muestran una zona opaca y un halo claro alrededor de la colonia.~~

**~~B.15.5.8~~** ~~Seleccionar las colonias de acuerdo con el siguiente cuadro para realizar las pruebas de coagulasa y termonucleasa:~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~NUMERO DE COLONIAS~~** | **~~NUMERO DE COLONIAS SOSPECHOSAS EN PLACA POR PROBAR~~** |
| ~~Menos de 50~~ | ~~3~~ |
| ~~51 a 100~~ | ~~5~~ |
| ~~101 a 150 o más~~ | ~~7~~ |

**~~B.15.5.9~~** ~~Seleccionar el número de colonias y sembrar cada una en tubos con 0,5 ml de caldo de infusión cerebro-corazón.~~

**~~B.15.5.10~~** ~~Incubar a 35ºC durante 24 h.~~

**~~B.15.5.11~~** ~~Inocular en la misma forma cepas conocidas de Staphylococcus aureus y Staphylococcus epidermidis como testigos positivo y negativo.~~

**~~B.15.5.12~~** ~~Después del periodo de incubación pasar con una pipeta de 1 ml, 0,3 ml de cada cultivo a otro tubo de 10 mm x 75 mm y conservarlo para la prueba de termonucleasa. El resto del cultivo se usa para la prueba de coagulasa.~~

**~~B.15.5.13~~** ~~Prueba de coagulasa~~

**~~B.15.5.13.1~~** ~~Agregar a los 0,2 ml del cultivo anterior, 0,2 ml de plasma de conejo diluido volumen a volumen con solución salina estéril.~~

**~~B.15.5.13.2~~** ~~Incubar en baño de agua de 35 a 37ºC y observar durante 6 h a intervalos de 1 h; si no hay formación de coágulo, observar a las 24 h. Considerar positiva la prueba si hay formación de coágulo.~~

~~Para comprobar la coagulabilidad del plasma de conejo se añade una gota de cloruro de calcio al 5% a 0,5 ml de plasma reconstituido empleado, formándose un coágulo en 10-15 seg.~~

**~~B.15.5.14~~** ~~Prueba de termonucleasa~~

**~~B.15.5.14.1~~** ~~Calentar durante 15 min, 0,3 ml de cultivo en caldo de infusión cerebro-corazón en baño de agua hirviendo.~~

**~~B.15.5.14.2~~** ~~Pasar una gota de cada cultivo por medio de una pipeta Pasteur a un orificio del medio, incluye testigo.~~

**~~B.15.5.14.3~~** ~~Incubar a 35ºC en cámara húmeda de 4 a 24 h.~~

**~~B.15.5.14.4~~** ~~La aparición de un halo color rosa extendido de por lo menos 1 mm alrededor de la perforación se califica como positiva.~~

**~~B.15.6 Cálculo y expresión de resultados~~**

**~~B.15.6.1~~** ~~Cálculo~~

~~Hacer el cálculo del contenido de microorganismos en el producto tomando en cuenta el número de colonias totales, el número de colonias confirmadas, la dilución y el volumen inoculado (0,1 ml).~~

**~~Ejemplo 1:~~**

~~Si la caja tiene 80 colonias en la dilución 1:1000~~

~~Se toman 5 colonias para la prueba, de éstas dan 4 positivas, el cálculo es:~~

~~80 x 4 = 64 x 1000 x 10 = 640 000~~

~~5~~

**~~Ejemplo 2:~~**

~~Si la caja tiene 14 colonias en la dilución 1:10~~

~~Se toman 3 colonias para la prueba, de éstas dan 2 positivas, el cálculo es:~~

~~14 x 2 = 9,3 x 10 x 10 = 930~~

~~3~~

**~~B.15.6.2~~** ~~Expresión de los resultados:~~

~~Según ejemplo 1:~~

~~Informar como~~ *~~Staphylococcus aureus~~* ~~640 000 UFC/g~~

~~Según ejemplo 2:~~

~~Informar como Staphylococcus aureus 930 UFC/g valor estimado~~

~~Si las pruebas confirmativas resultan negativas en todas las colonias probadas, informar como:~~

~~0 UFC/g en muestras directas~~

~~-10 UFC/g en muestras de dilución 1:10~~

~~-100 UFC/g en muestras de dilución 1:100~~

~~En la práctica los resultados pueden variar, esto dependerá del técnico que trabaje el método y el grado de confiabilidad del mismo, que en el 95% de los casos es de ± 16% a ± 52%.~~

**B.16. METODO DE PRUEBA MICROBIOLOGICO PARA ALIMENTOS. DETERMINACION DE** *L. monocytogenes* **(Este Capítulo quedará sin efectos a los 180 días naturales, debido a la entrada en vigor de la NOM-210-SSA1-2014, Art. Primero Transitorio de la mencionada NOM publicada el 26/VI/2015).**

**~~B.16.1~~** ~~Fundamento~~

~~El método para detectar la presencia de~~ *~~Listeria~~**~~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.~~

**~~B.16.2~~** ~~Reactivos~~

~~Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico.~~

~~Cuando se indica agua, debe entenderse que se trata de agua destilada.~~

~~Acido acético 5 N~~

~~Acido clorhídrico 1 M~~

~~Acido sulfanílico (cristales)~~

~~Alfa-naftilamina~~

~~Alfa-naftol 5% en etanol absoluto~~

~~Etanol absoluto~~

~~Granalla de zinc~~

~~Hidróxido de sodio 1 M~~

~~Lactamato de glicil-glicina (anhídrido de glicina)~~

~~Regulador de fosfatos glicerinado con pH 9,0 ± 0,2~~

~~Sangre de carnero desfibrinada~~

~~Solución al 3% de peróxido de hidrógeno~~

~~Solución salina fisiológica 0,85% estéril~~

~~Sueros comerciales para tipificación de Listeria spp~~

~~Sulfato de cadmio al 20%~~

~~Zinc pulverizado~~

**~~B.16.2.1~~** ~~Reactivos para Tinción de Gram~~

**~~B.16.2.1.1~~** ~~Alcohol-acetona~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Etanol (95%)~~ | ~~700,0 ml~~ |
| ~~Acetona~~ | ~~300,0 ml~~ |

~~Mezclar ambos líquidos.~~

**~~B.16.2.1.2~~** ~~Cristal violeta~~

**~~Solución A~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Cristal violeta~~ | ~~2,0 g~~ |
| ~~Etanol (95%)~~ | ~~20,0 ml~~ |

~~Disolver el cristal violeta en el etanol.~~

**~~Solución B~~**

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Oxalato de amonio~~ | ~~0,8 g~~ |
| ~~Agua~~ | ~~80,0 ml~~ |

~~Disolver el oxalato de amonio en el agua. Después de preparar las soluciones A y B, verter una en la otra y agitar hasta que se mezclen perfectamente.~~

**~~B.16.2.1.3~~** ~~Solución de Yodo~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Yodo~~ | ~~1,0 g~~ |
| ~~Yoduro de potasio~~ | ~~2,0 g~~ |
| ~~Agua~~ | ~~300,0 ml~~ |

~~Triturar finamente el yodo y el yoduro de potasio en un mortero, de ser posible en una campana de extracción. Añadir una pequeña cantidad de agua para lavar el material, agregar el resto del agua y agitar.~~

~~Nota: ¡Evitar el contacto de los reactivos con la piel!~~

**~~B.16.2.1.4~~** ~~Solución de Safranina~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Safranina~~ | ~~0,25 g~~ |
| ~~Etanol (95%)~~ | ~~10,00 ml~~ |
| ~~Agua~~ | ~~100,00 ml~~ |

~~Disolver la safranina en el etanol, mezclar, agregar el agua y volver a agitar. Filtrar la solución con papel filtro.~~

**~~B.16.2.2~~** ~~Reactivos para la determinación de nitritos~~

**~~B.16.2.2.1~~** ~~Reactivo A~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Alfa-naftilamina~~ | ~~0,5 g~~ |
| ~~Acido acético 5N~~ | ~~100,0 ml~~ |

**~~B.16.2.2.2~~** ~~Reactivo B~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Acido sulfanílico~~ | ~~1,0 g~~ |
| ~~Acido acético 5N~~ | ~~125,0 ml~~ |

**~~B.16.2.2.3~~** ~~Reactivo C~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Alfa-naftol~~ | ~~1,0 g~~ |
| ~~Acido acético 5N~~ | ~~200,0 ml~~ |

**~~B.16.2.2.4~~** ~~Solución de sulfato de cadmio al 20%~~

~~Colocar granallas de zinc en solución de sulfato de cadmio al 20% de 4 a 6 h. Disolver el precipitado de cadmio, adicionando ácido clorhídrico 1N.~~

**~~B.16.3~~** ~~Medios de cultivo~~

~~A continuación se presentan las fórmulas y los procedimientos para preparar los medios empleados en este análisis microbiológico. En caso de disponer de fórmulas comerciales deshidratadas se deben seguir las instrucciones del fabricante para su preparación.~~

**~~B.16.3.1~~** ~~Caldo soya tripticaseína con 0,6 % de extracto de levadura (CSTEL)~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Caldo soya tripticaseína~~ | ~~30,0 g~~ |
| ~~Extracto de levadura~~ | ~~6,0 g~~ |
| ~~Agua~~ | ~~1000,0 ml~~ |

~~Agitar hasta disolver los ingredientes. Esterilizar a 121 ± 1ºC durante 15 min. El pH final de la solución debe ser 7,3 ± 0,2.~~

**~~B.16.3.2~~** ~~Caldo de enriquecimiento (EB) pH 7,3~~

~~Un litro de caldo soya tripticaseína con extracto de levadura (CSTEL) debe contener los siguientes suplementos:~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Suplementos~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Clorhidrato de acriflavina~~ | ~~15,0 mg~~ |
| ~~Acido nalidíxico (sal sódica)~~ | ~~40,0 mg~~ |
| ~~Cicloheximida~~ | ~~50,0 mg~~ |
| ~~Acido pirúvico (sal sódica) Solución al 10 % (p/v) \*~~ | ~~11,1 ml~~ |

~~Preparar los suplementos de acriflavina y nalidíxico a partir de una solución al 0,5 % (p/v) con agua.~~

~~El suplemento de cicloheximida prepararlo como una solución al 1,0 % (p/v) en una solución al 40 % (v/v) de etanol en agua. Esterilizar por filtración los suplementos. Agregar en condiciones asépticas los suplementos al medio CSTEL previamente esterilizado, justo antes de su uso. Para la preparación de un litro del medio CSTEL se debe partir de las soluciones anteriores, agregando las siguientes cantidades: 3,0 ml de acriflavina, 8,0 ml de ácido nalidíxico y 5,0 ml de solución de cicloheximida. Precaución: ¡La cicloheximida es una sustancia química altamente tóxica, durante su manejo deben emplearse guantes, lentes de protección y lavarse las manos inmediatamente después de usarla!~~

**~~B.16.3.3~~** ~~Medio de cloruro de litio feniletanol-moxolactam (LMP)~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Agar fenil etanol~~ | ~~35,5 g~~ |
| ~~Glicina anhídra~~ | ~~10,0 g~~ |
| ~~Cloruro de litio~~ | ~~5,0 g~~ |
| ~~Solución de moxolactam al 1 % en amortiguador de fosfatos pH 6,0~~ | ~~2,0 ml~~ |
| ~~Agua~~ | ~~1000,0 ml~~ |

~~Esterilizar el medio (sin moxolactam) en autoclave a 121 ± 1ºC durante 15 min. Enfriar de 48 a 50ºC y agregar la solución de moxolactam previamente esterilizada por filtración. Distribuir volúmenes de 12 a 15 ml del medio en cajas de Petri estériles. Las placas delgadas facilitan la observación de las colonias.~~

**~~B.16.3.4~~** ~~Medio Oxford~~

**~~B.16.3.4.1~~** ~~Medio base Oxford (OXA)~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Base de agar Columbia~~ | ~~39,0 g~~ |
| ~~Esculina~~ | ~~1,0 g~~ |
| ~~Citrato férrico amónico~~ | ~~0,5 g~~ |
| ~~Cloruro de litio~~ | ~~15,0 g~~ |
| ~~Agua~~ | ~~1000,0 ml~~ |

~~Agregar los ingredientes a un litro de agua y llevar a ebullición hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave a 121 ± 1ºC durante 15 min. Enfriar a 50ºC el medio base y en condiciones asépticas agregar los suplementos. Un litro de medio Oxford debe contener los siguientes suplementos:~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Suplementos~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Cicloheximida~~ | ~~400 mg~~ |
| ~~Sulfato de colistina~~ | ~~20 mg~~ |
| ~~Acriflavina~~ | ~~5 mg~~ |
| ~~Cefotetán~~ | ~~2 mg~~ |
| ~~Fosfomicina~~ | ~~10 mg~~ |

~~Disolver la cicloheximida, el sulfato de colestina, acriflavina, cefotetán y la fosfomicina en 10 ml de una mezcla 1:1 de etanol: agua. Esterilizar por filtración antes de agregar al medio base. Mezclar y vaciar en cajas Petri estériles. Las placas del medio Oxford se pueden almacenar como máximo dos semanas.~~

**~~B.16.3.5~~** ~~Agar soya tripticaseína con 0,6% de extracto de levadura (ASTEL)~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Agar soya tripticaseína~~ | ~~40,0 g~~ |
| ~~Extracto de levadura~~ | ~~6,0 g~~ |
| ~~Agua~~ | ~~1000,0 ml~~ |

~~Agitar y calentar a ebullición hasta disolver el agar. Esterilizar a 121 ± 1ºC durante 15 min. pH final 7,3 ± 0,2.~~

**~~B.16.3.6~~** ~~Agar sangre de carnero~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Base de agar sangre~~ | ~~95,0 ml~~ |
| ~~Sangre de carnero desfibrinada~~ | ~~5,0 ml~~ |

~~Preparar el agar base de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Enfriar a 45 ± 2ºC y agregar asépticamente la sangre de carnero, la cual previamente se debe encontrar a temperatura ambiente (20 - 25°C). Homogeneizar el medio y verter en las cajas Petri estériles de 12 a 15 ml para la prueba de CAMP y de 15 a 20 ml para la prueba de hemólisis.~~

**~~B.16.3.7~~** ~~Caldo nitratos~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Nitrato de potasio~~ | ~~1,0 g~~ |
| ~~Cloruro de sodio~~ | ~~0,5 g~~ |
| ~~Peptona~~ | ~~2,0 g~~ |
| ~~Agua~~ | ~~1000,0 ml~~ |

~~Agregar los ingredientes a un litro de agua, agitar hasta disolución completa. Verter en tubos de 13 x 100 mm con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave a 121 ± 1°C durante 15 min.~~

**~~B.16.3.8~~** ~~Medios para la prueba de movilidad~~

**~~B.16.3.8.1~~** ~~Medio de SIM~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Peptona de caseína~~ | ~~20,0 g~~ |
| ~~Peptona de carne~~ | ~~6,1 g~~ |
| ~~Sulfato de fierro y amonio~~ | ~~0,2 g~~ |
| ~~Tiosulfato de sodio~~ | ~~0,2 g~~ |
| ~~Agar~~ | ~~3,5 g~~ |
| ~~Agua~~ | ~~1000,0 ml~~ |

~~Agitar y calentar a ebullición hasta disolver el agar. Envasar en porciones de 4 ml en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar en autoclave a 121 ± 1°C durante 15 min. pH final 7,3 ± 0,2.~~

**~~B.16.3.8.2~~** ~~Medio MTM~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Extracto de carne~~ | ~~3,0 g~~ |
| ~~Peptona~~ | ~~10,0 g~~ |
| ~~Cloruro de sodio (NaCl)~~ | ~~5,0 g~~ |
| ~~Agar~~ | ~~4,0 g~~ |
| ~~Agua~~ | ~~1000,0 ml~~ |

~~Agitar y calentar a ebullición hasta disolver el agar. Envasar en porciones de 4 ml en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar en autoclave a 121 ± 1ºC durante 15 min. pH final 7,4 ± 0,2.~~

**~~B.16.3.9~~** ~~Caldo púrpura para fermentación de carbohidratos~~

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Ingredientes~~** | **~~Cantidad~~** |
| ~~Proteosa peptona No. 3~~ | ~~10,00 g~~ |
| ~~Cloruro de sodio~~ | ~~5,00 g~~ |
| ~~Extracto de carne~~ | ~~1,00 g~~ |
| ~~Púrpura de bromocresol~~ | ~~0,02 g~~ |
| ~~Agua~~ | ~~1000,00 ml~~ |

~~Calentar si es necesario para disolver los ingredientes. Esterilizar en autoclave durante 15 min. a 121 ± 1°C pH final 6,8 ± 0,2. Agregar la solución del carbohidrato, previamente esterilizada, por filtración en cantidad suficiente para obtener una concentración final de 0,5 %.~~

**~~Nota:~~** ~~Los sistemas bioquímicos comerciales validados pueden usarse como alternativa para las pruebas bioquímicas convencionales.~~

**~~B.16.4~~** ~~Materiales~~

~~Aceite de inmersión~~

~~Asas bacteriológicas~~

~~Cajas Petri~~

~~Cubreobjetos~~

~~Matraces Erlenmeyer de 500 ml~~

~~Lámpara de luz blanca~~

~~Lápiz graso o marcador~~

~~Lupa de bajo aumento~~

~~Pipetas volumétricas de 25, 10 y 1,0 ml~~

~~Portaobjetos escabado~~

~~Portaasas~~

~~Tubos de 16 x 125 mm~~

~~Tubos de 13 x 100 mm u otros con tapón de rosca~~

~~Sistema de filtración con membranas con un tamaño de poro de 0,45 µm~~

**~~B.16.5~~** ~~Aparatos e instrumentos~~

~~Se requiere además de lo mencionado en el método de Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico, lo siguiente:~~

~~Incubadoras con termostato que evite variaciones mayores de ± 1,0ºC, provista con termómetro calibrado.~~

~~Microscopio de contraste de fases con objetivo de inmersión en aceite (100 X) o microscopio de campo oscuro.~~

**~~B.16.6~~** ~~Preparación de la muestra~~

~~Para la preparación de la muestra seguir lo mencionado en el método Preparación y Dilución de muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.~~

**~~B.16.7~~** ~~Procedimiento~~

~~Este método debe realizarlo un microbiólogo experimentado, en un ambiente controlado, aislado de áreas de producción de alimentos. Se debe tener especial cuidado en la disposición de aquellos materiales y equipo que hayan estado en contacto con alimentos sospechosos, antes de desecharlos o volver a utilizarlos. Esta técnica por ningún motivo debe aplicarla personal inmunocomprometido ya sea por enfermedad o por el uso de medicamentos, mujeres embarazadas o personas de edad avanzada.~~

**~~B.16.7.1~~** ~~Procedimiento de enriquecimiento~~

~~Tomar una muestra representativa del alimento, tanto de la superficie externa como del interior. Colocar 25 ml o 25 g de la muestra en un recipiente conteniendo 225 ml de medio de enriquecimiento (EB), homogeneizar e incubar por 48 h a 30ºC. En el caso de muestras en donde se sospecha que tienen células de~~ *~~Listeria~~* ~~spp dañadas, se recomienda la incubación en un caldo de enriquecimiento que contenga piruvato de sodio al 0,1 % (p/v) incubado a 30°C por 6 h sin suplementos. Después de las 6 h de incubación los suplementos deben agregarse y continuar la incubación a 30ºC hasta un total de 48 h.~~

**~~B.16.7.1.1~~** ~~Aislamiento~~

~~Después de 24 y 48 h de incubación en el medio EB, resembrar en los medios LMP y OXA. Incubar las placas del medio LMP a 30ºC por 24 a 48 h y las de medio OXA a 35ºC por el mismo periodo. Observar el crecimiento en las placas del medio LMP con luz blanca en un ángulo de 45º (iluminación de Henry), a simple vista o con la ayuda de una lupa. En este medio generalmente aparecen las colonias de color blanco o azul iridiscentes. Ver la figura 1. En el medio OXA las colonias de~~ *~~Listeria~~* ~~son negras, con halo negro. Algunas colonias pueden aparecer con un tono café oscuro que se define mejor a los siete días de incubación.~~

~~Seleccionar cinco o más colonias típicas del medio de OXA o LMP y pasar a placas de medio ASTEL. Este paso es importante debido a que las colonias aparentemente aisladas en los medios OXA y LMP pueden estar contaminadas con flora competitiva parcialmente inhibida, invisible a simple vista.~~

~~Debido a que puede estar presente más de una especie de~~ *~~Listeria~~* ~~en la muestra, deben identificarse como mínimo cinco colonias.~~

~~~~

**~~B.16.7.2~~** ~~Identificación~~

~~Se deben utilizar cepas de referencia positivas y negativas para cada una de las pruebas. Seleccionar colonias típicas y sembrar en medio ASTEL. Incubar a 35ºC por 24 h. Estos cultivos pueden mantenerse a 4ºC y utilizarse como inóculo para realizar las pruebas de identificación.~~

**~~B.16.7.2.1~~** ~~Prueba de movilidad en fresco~~

~~Hacer preparaciones en fresco (en gota suspendida o entre porta y cubreobjetos) utilizando solución salina al 0,85%. La suspensión debe ser densa y emulsificarse completamente, y observar con objetivo de inmersión en un microscopio de contraste de fase o microscopio de campo oscuro. Las células de~~ *~~Listeria~~* ~~spp son bacilos cortos con movilidad rotatoria o como si brincaran. Los bacilos con movimientos rápidos no son~~ *~~Listeria~~* ~~spp.~~

**~~B.16.7.2.2~~** ~~Prueba de catalasa~~

~~Emulsificar un cultivo puro, con una gota de solución de peróxido al 3%. La formación inmediata de burbujas indica que la prueba es positiva. Las especies de~~ *~~Listeria~~* ~~son catalasa positivo.~~

~~¡Precauciones, la emulsión debe realizarse con una asa de plástico o palillo de madera estéril evitando el contacto del metal con el reactivo. Si las colonias provienen de agar base con sangre. Cualquier contaminación de eritrocitos puede dar pruebas falsas positivas!~~

**~~B.16.7.2.3~~** ~~Tinción de Gram~~

~~Hacer una tinción de Gram de cultivos de 16 a 24 h. Todas las especies de~~ *~~Listeria~~* ~~son bacilos cortos Grampositivo; sin embargo en cultivos viejos pueden presentarse como formas cocoides. En extensiones delgadas se observan de color pálido y pueden confundirse con Bacteroides spp.~~

**~~B.16.7.2.4~~** ~~Prueba de hemólisis~~

~~Dibujar una cuadrícula de 20 a 25 espacios en el fondo de la placa de agar sangre de carnero al 5%. Inocular por picadura un cuadro por cada cultivo. Incubar por 48 h a 35ºC. Al inocular, observar la reacción hemolítica en las placas.~~ *~~L. monocytogenes~~* ~~y~~ *~~L. seeligeri~~* ~~producen una zona ligeramente clara alrededor del punto de picadura. Confirmar las reacciones dudosas con la prueba de CAMP.~~

**~~B.16.7.2.5~~** ~~Prueba de reducción de nitratos~~

~~Inocular los tubos conteniendo caldo nitratos, incubar a 35ºC por 5 días. Para la lectura se debe agregar 0,2 ml del reactivo A y 0,2 ml del reactivo B, un color rojo indica una prueba positiva (presencia de nitritos). Si esta coloración no se observa, adicionar zinc en polvo. El desarrollo de color rojo después de una hora confirma una prueba negativa (presencia de nitratos). En forma alternativa adicionar al cultivo en caldo nitratos 0,2 ml del reactivo B y 0,2 ml del reactivo C. Un color naranja indica una prueba positiva (presencia de nitritos). Si esta coloración no se observa, adicionar 0,2 ml del reactivo de cadmio, el desarrollo de un color naranja confirma una prueba negativa (presencia de nitratos). Este procedimiento alternativo elimina el uso del alfa-naftilamina, que es carcinogénica.~~

**~~B.16.7.2.6~~** ~~Prueba de movilidad en agar~~

~~Inocular el medio SIM o MTM, incubar por 7 días a temperatura ambiente (20-25ºC), observar diariamente. Las especies de~~ *~~Listeria~~* ~~son móviles, dando un crecimiento típico en forma de paraguas.~~

**~~B.16.7.2.7~~** ~~Prueba de utilización de carbohidratos~~

~~Inocular tubos de caldo púrpura para fermentación de carbohidratos al 0,5 %: dextrosa, esculina, maltosa, ramnosa, manitol y xilosa. Incubar 7 días a 35ºC. Una coloración amarilla indica una prueba positiva. Todas las especies de~~ *~~Listeria~~* ~~dan positivas las pruebas para dextrosa, esculina y maltosa. Consultar el cuadro 1 para reacciones con ramnosa, xilosa y manitol. Si la pigmentación prematura del aislamiento en el medio OXA no deja lugar a duda, el ensayo de esculina puede omitirse.~~

**~~B.16.7.2.8~~** ~~Prueba de Cristie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP)~~

~~Para la prueba de CAMP se emplean las siguientes cepas de colección de~~ *~~S. aureus~~* ~~y~~ *~~R. equi:~~*

*~~Staphylococcus aureus~~* ~~Rhodococcus equi~~

~~ATCC 49444 ATCC 6339~~

~~NCTC 7428 NCTC 1621~~

~~ATCC 25923~~

~~CIP 5710~~

~~Las cepas empleadas en la prueba de CAMP pueden obtenerse de diversas colecciones nacionales e internacionales.~~

~~En una placa de agar sangre de carnero sembrar una estría de la cepa de~~ *~~S. aureus~~* ~~y, paralelamente una de R. equi, separadas lo suficiente para que entre éstas se puedan estriar perpendicularmente las cepas sospechosas de~~ *~~Listeria~~*~~, sin que lleguen a tocarse (aproximadamente 5 mm de separación). Después de 24 y 48 h de incubación a 35°C observar el sinergismo entre las hemolisinas de S. aureus, R. equi y Listeria que se manifiesta como una zona hemolítica más intensa.~~

~~La figura 2 muestra la disposición de las estrías de los cultivos en una placa para la prueba de CAMP. La hemólisis de~~ *~~L. monocytogenes~~* ~~y~~ *~~L. seeligeri~~* ~~se incrementa cerca de la estría de~~ *~~S. aureus,~~* ~~y la hemólisis de~~ *~~L. ivanovii~~* ~~se aumenta cerca de la estría de R. equi. Las especies restantes no son hemolíticas en esta prueba.~~

~~~~

~~Prueba de CAMP para~~ *~~Listeria monocytogenes~~*~~:~~

~~Diseño de la inoculación en placas de agar sangre de carnero. Las líneas horizontales representan las estrías de la inoculación de cinco cepas. Las líneas verticales representan las estrías de inoculación de~~ *~~S. aureus~~* ~~(S) y R. equi (R). Las líneas sombreadas indican el incremento de hemólisis en esas regiones.~~

~~Cuadro 1. Diferenciación de las Especies de~~ *~~Listeria~~*

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **~~Especies~~** | **~~HemolItico(beta)~~~~a~~** | **~~ReducciOn nitratos~~** | **~~ProducciOn de Acidos~~** | | **~~CAMPO~~** | | |
|  |  |  | ~~M~~ | ~~R~~ | ~~X~~ | ~~S.a~~ | ~~R.e~~ |
| ~~L. monocytogenes~~ | ~~+~~ | ~~-~~ | ~~-~~ | ~~+~~ | ~~-~~ | ~~+~~ | ~~-~~ |
| ~~L. ivanovii~~ | ~~+~~ | ~~-~~ | ~~-~~ | ~~-~~ | ~~+~~ | ~~-~~ | ~~+~~ |
| ~~L. innocua~~ | ~~-~~ | ~~-~~ | ~~-~~ | ~~b~~~~V~~ | ~~-~~ | ~~-~~ | ~~-~~ |
| ~~L. welshimeri~~ | ~~-~~ | ~~-~~ | ~~-~~ | ~~b~~~~V~~ | ~~+~~ | ~~-~~ | ~~-~~ |
| ~~L. seeligeri~~ | ~~+~~ | ~~-~~ | ~~-~~ | ~~-~~ | ~~+~~ | ~~+1~~ | ~~-~~ |
| ~~L. grayic~~ | ~~-~~ | ~~b~~~~V~~ | ~~+~~ | ~~b~~~~V~~ | ~~-~~ | ~~-~~ | ~~-~~ |

~~a Sangre de carnero desfibrinada~~

~~b~~~~V Variable~~

~~L. grayi incluye ahora las cepas de la especie L. murrayi reductoras de nitratos y ramnosa variable~~

~~M Manitol~~

~~R Ramnosa~~

~~X Xilosa~~

~~S.a Staphylococcus aureus~~

~~R.e Rhodococcus equi~~

**~~B.16.7.3~~** ~~Serología~~

~~La determinación de los tipos serológicos de Listeria se aplica cuando las consideraciones epidemiológicas sean cruciales. Inocular en caldo de triptosa por 24 h a 35ºC. Transferir a dos tubos de agar inclinado de triptosa e incubar 24 h a 35ºC. Para realizar la prueba se pueden utilizar sueros comerciales, siguiendo las instrucciones del fabricante.~~

**~~Cuadro 2.~~** ~~Serología de las especies de~~ *~~Listeria~~*

|  |  |
| --- | --- |
| **~~Especies~~** | **~~Serotipo~~** |
| ~~L. monocytogenes~~ | ~~1/2A, 1/2B, 1/2C~~ |
|  | ~~3A, 3B, 3C~~ |
|  | ~~4A, 4AB, 4B~~ |
|  | ~~4C, 4D, 4E, "7"~~ |
| ~~L. ivanovii~~ | ~~5~~ |
| ~~L. innocua~~ | ~~4AB, 6A, 6B, Un~~ ~~a~~ |
| ~~L. welshimeri~~ | ~~6A, 6B~~ |
| ~~L. seeligeri~~ | ~~1/2B, 4C, 4D, 6B, Un~~ ~~a~~ |

**~~B.16.8~~** ~~Expresión de resultados~~

~~Comparar los resultados obtenidos con el cuadro 1 y determinar el género y especie de las cepas aisladas. La correspondencia de resultados con el cuadro anterior indica la presencia del género~~ *~~Listeria.~~*

~~El único miembro del género~~ *~~Listeria~~* ~~de importancia para esta norma es~~ *~~Listeria monocytogenes.~~*

~~B.16.9 Informe de la prueba~~

~~Cuando los resultados sean positivos para~~ *~~L. monocytogenes~~* ~~informar la presencia en 25 g o 25 ml de muestra. Y si los resultados son negativos informar ausencia en 25 g o 25 ml de muestra.~~

**B.17. DE LA ESTIMACION DE LA DENSIDAD MICROBIANA POR LA TECNICA DEL NUMERO MAS PROBABLE. DETERMINACION DE BACTERIAS COLIFORMES, COLIFORMES FECALES Y *Escherichia coli* POR LA TECNICA DE DILUCIONES EN TUBO MULTIPLE.**

Este método es aplicable a cualquier grupo bacteriano de interés sanitario, especialmente en productos que se encuentran en bajas concentraciones de microorganismos (10 por gramo o ml). Ejemplo: Leche, agua, alimentos; que por su consistencia pueden interferir con la exactitud de la cuenta de Unidades Formadoras de Colonias (U.F.C.).

**B.17.1 Fundamento.**

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 más alta sean negativos. El resultado positivo se demuestra por la presencia de gas o crecimiento microbiano.

Para obtener el Número Más Probable (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.

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 3, 5 o 10 tubos en serie. A medida que el número de tubos inoculados para cada dilución aumentan se reducen los límites de confianza.

**B.17.2 Equipo, materiales y reactivos**.

No aplica.

**B.17.3 Procedimientos.**

**B.17.3.1** Uso de tablas de NMP con 95% de límite de confianza.

Las tablas 1-3 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 (para las combinaciones de 3 y 5 tubos) de las tablas 4 y 5; también se puede aplicar una ecuación (véase punto B.2) para obtener el NMP aproximado.

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.

Cuando se preparan más de 3 diluciones de una muestra, el NMP deberá determinarse a partir de tres diluciones consecutivas (usando tablas 1-3). 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 las tablas 6 y 7). Cuando en ninguna de las diluciones probadas hubiera crecimiento en todos los tubos, seleccionar (si es posible) las primeras tres diluciones consecutivas (volumen de muestra) para que la dilución media contenga resultados positivos (C de tablas 6 y 7).

Con frecuencia es necesario el NMP desde el inicio con volúmenes diferentes de los enlistados en las tablas 1-5. Si el volumen de muestra es mayor que 0,01 g multiplicar el NMP enlistado en la tabla por 10. El resultado de una determinación de 5 tubos que dé 3 tubos positivos en 0,01 g; 2 tubos positivos en 0,001 g y 1 tubo positivo en 0,0001 g (3-2-1) leer en la tabla No. 2 como 17 y multiplicar por 10 para así obtener 170 como el NMP actual por gramo de muestra. De igual forma si la cantidad más grande utilizada para la tabla de referencia es 1 g en lugar de 0,1 g, dividir el NMP derivado de la tabla entre 10. Por ejemplo el resultado de la determinación del NMP en 3 tubos para *Salmonella* sppque dé 3 tubos positivos en 1 g; 1 tubo positivo en 0,1 g y ningún positivo en 0,01 g (3-1-0) leer en la tabla No. 1 como 43 y dividir entre 10, lo que da 4,3 como el NMP presuntivo por gramo de muestra.

Un método alternativo para obtener el número más probable es usando la siguiente fórmula:

(NMP/g de la tabla - 100) X factor de dilución del tubo de enmedio = NMP/g

Para calcular el NMP/100 g multiplicar por 100.

**B.17.3.2** **Cálculo aproximado del NMP y 95% de límite de confianza.**

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 está dado por la siguiente ecuación: 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  4  2  1  0,5  0,25 | 5  5  5  5  5  5 | 5  4  2  0  1  0 |

El número de tubos positivos es: P = (5 + 4 + 2 + 1) = 12; N = (8x0) + (4x1) + (2x3) + (1x5) + (0,5x4) + (0,25x5) = 18,25; y T = 5 (8+4+2+1+0,5+0,25) = 78,75

NPM/g = 12/(18,25 x 78,75)1/2 = 0,32/g o 32/100 g

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

log (NMP/g) 1,08 (log a)/n) 1/2

Donde: a es el radio de dilución y n es el número de tubos por dilución. Esta expresión asume que el radio de dilución es diferente de 1:10 (por ejemplo 1:2). Para diluciones de 1:10, la cantidad por restar o sumar deberá ser de 1,14(n)½ para la mejor estimación. Si el número de tubos por dilución (ni) es desigual (por ejemplo: un accidente de laboratorio) para la dilución k reemplazar n por la expresión nH (media armónica) por el número de tubos por dilución (ni).

La media armónica se define como:

nH = k / (1/ ni )

k es el número de diluciones. Por ejemplo: Suponiendo que el resultado de 3 diluciones en ni fuera 5-4-4.

Por lo tanto nH = 3/(1/5) + (1/4) + (1/4) ½ = 3/0,70 = 4,3i

Para el ejemplo anterior el NMP con n = 5 y un límite de confianza aproximado de 95% será el siguiente:

log 0,32 (1,08) (log 2)/5) ½

-0,4950,265

Entonces el límite inferior es el antilogaritmo (-0-76) = 0.17/g o 17/100 g y el límite inferior 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.

**Tabla No. 1 Selección del NMP con un límite de confianza de 95% para la prueba de fermentación utilizando 3 tubos: con porciones de 0,1, 0,01 y 0,001 g (ml) de muestra.**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| No. de tubos positivos | | |  | 95% de límite de confianza | |
| 0,1 | 0,01 | 0,001 | NMP/g (ml)b | Inferior | Superior |
| 0 | 0 | 0 | 3 | - | - |
| 0 | 1 | 0 | 3+ | 1 | 17 |
| 1 | 0 | 0 | 4 | 1 | 21 |
| 1 | 0 | 1 | 7+ | 2 | 27 |
| 1 | 1 | 0 | 7 | 2 | 28 |
| 1 | 2 | 0 | 11+ | 4 | 35 |
| 2 | 0 | 0 | 9 | 2 | 38 |
| 2 | 0 | 1 | 14+ | 5 | 48 |
| 2 | 1 | 0 | 15 | 5 | 50 |
| 2 | 1 | 1 | 20+ | 7 | 60 |
| 2 | 2 | 0 | 21 | 8 | 62 |
| 3 | 0 | 0 | 23 | 9 | 130 |
| 3 | 0 | 1 | 39 | 10 | 180 |
| 3 | 1 | 0 | 43 | 10 | 210 |
| 3 | 1 | 1 | 75 | 20 | 280 |
| 3 | 2 | 0 | 93 | 30 | 380 |
| 3 | 2 | 1 | 150 | 50 | 500 |
| 3 | 2 | 2 | 210+ | 80 | 640 |
| 3 | 3 | 0 | 240 | 90 | 1400 |
| 3 | 3 | 1 | 460 | 100 | 2400 |
| 3 | 3 | 2 | 1100 | 300 | 4800 |
| 3 | 3 | 3 | 1100 | - | - |

a Los resultados normales, obtenidos en un 95% de las pruebas no están seguidos por un símbolo más (+). Menos del 4% de los resultados de las pruebas obtenidos están marcados por un símbolo más (+). Combinaciones de tubos positivos no encontrados en esta tabla se presentan en menos del 1% de las pruebas y si se presentaran con mayor frecuencia indican un error de técnica o que el valor del número más probable se encuentra en el límite. El NMP de combinaciones que no aparecen en la tabla, se puede obtener por extrapolación a la combinación cercana más elevada.

b Multiplicar todos los valores de NMP/g (ml) por 100 para expresarlos como NMP/100 g (ml).

**Tabla No. 2 Selección del NMP con un límite de confianza de 95% para la prueba de fermentación utilizando 5 tubos: con porciones de 0,1, 0,01 y 0,001 g (ml) de muestraa.**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| No. de tubos positivos | | |  | 95% de límite de confianza | |
| 0,1 | 0,01 | 0,001 | NMP/g (ml)b | Inferior | Superior |
|  |  |  |  |  |  |
| 0 | 0 | 0 | 2 | - | - |
| 0 | 0 | 1 | 2+ | 1 | 10 |
| 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 10 |
| 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 11 |
| 1 | 0 | 1 | 4+ | 1 | 15 |
| 1 | 1 | 0 | 4 | 1 | 15 |
| 1 | 2 | 0 | 6+ | 2 | 18 |
| 2 | 0 | 0 | 4 | 1 | 17 |
| 2 | 0 | 1 | 7+ | 2 | 20 |
| 2 | 1 | 0 | 7 | 2 | 21 |
| 2 | 1 | 1 | 9+ | 3 | 25 |
| 2 | 2 | 0 | 9 | 3 | 25 |
| 3 | 0 | 0 | 8 | 3 | 24 |
| 3 | 0 | 1 | 11 | 4 | 29 |
| 3 | 1 | 0 | 11 | 4 | 30 |
| 3 | 1 | 1 | 14+ | 6 | 35 |
| 3 | 2 | 0 | 14 | 6 | 35 |
| 3 | 2 | 1 | 17+ | 7 | 40 |
| 3 | 3 | 0 | 17+ | 7 | 41 |
| 4 | 0 | 0 | 13 | 5 | 38 |
| 4 | 0 | 1 | 17 | 7 | 45 |
| 4 | 1 | 0 | 17 | 7 | 46 |
| 4 | 1 | 1 | 21 | 9 | 55 |
| 4 | 2 | 0 | 22 | 9 | 56 |
| 4 | 2 | 1 | 26+ | 12 | 65 |
| 4 | 3 | 0 | 27 | 12 | 67 |
| 4 | 3 | 1 | 33+ | 15 | 77 |
| 4 | 4 | 0 | 34+ | 16 | 80 |
| 5 | 0 | 0 | 23 | 9 | 68 |
| 5 | 0 | 1 | 31 | 13 | 110 |
| 5 | 1 | 0 | 33 | 14 | 120 |
| 5 | 1 | 1 | 46 | 20 | 150 |
| 5 | 1 | 2 | 63+ | 22 | 180 |
| 5 | 2 | 0 | 49 | 21 | 170 |
| 5 | 2 | 1 | 70 | 30 | 210 |
| 5 | 2 | 2 | 94+ | 40 | 250 |
| 5 | 3 | 0 | 79 | 30 | 250 |
| 5 | 3 | 1 | 110 | 40 | 300 |
| 5 | 3 | 2 | 140 | 60 | 360 |
| 5 | 4 | 0 | 130 | 50 | 390 |
| 5 | 4 | 1 | 170 | 70 | 480 |
| 5 | 4 | 2 | 220 | 100 | 580 |
| 5 | 4 | 3 | 280+ | 120 | 690 |
| 5 | 4 | 4 | 350+ | 160 | 820 |
| 5 | 5 | 0 | 240 | 100 | 940 |
| 5 | 5 | 1 | 350 | 100 | 1300 |
| 5 | 5 | 2 | 540 | 220 | 2000 |
| 5 | 5 | 3 | 920 | 300 | 2900 |
| 5 | 5 | 4 | 1600 | 600 | 5300 |
| 5 | 5 | 5 | 1600 | - | - |

**a** Los resultados normales, obtenidos en un 95% de las pruebas, no están seguidos por un símbolo más(+). Menos del 4% de los resultados de las pruebas obtenidos están marcados por un símbolo más (+). Combinaciones de tubos positivos no encontrados en esta tabla se presentan en menos del 1% de las pruebas y si se presentaran con mayor frecuencia indican un error de técnica o que el valor del número más probable se encuentra en el límite. El NMP de combinaciones que no aparecen en la tabla, se pueden obtener por extrapolación a la combinación cercana más elevada.

b Multiplicar todos los valores de NMP/g (ml) por 100 para expresarlos como NMP/100 g (ml).

**Tabla No. 3 Selección del NMP con un límite de confianza de 95% para la prueba de fermentación utilizando 10 tubos: con porciones de 0,1, 0,01 y 0,001 g (ml) de muestraa.**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| No. de tubos positivos | | |  | 95% de límite de confianza | |
| 0,1 | 0,01 | 0,001 | NMP/g (ml)b | Inferior | Superior |
| 0 | 0 | 0 | 1 | - | - |
| 0 | 0 | 1 | 1+ | 1 | 5 |
| 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 5 |
| 0 | 2 | 0 | 2+ | 1 | 7 |
| 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 5 |
| 1 | 0 | 1 | 2+ | 1 | 7 |
| 1 | 1 | 0 | 2 | 1 | 7 |
| 1 | 2 | 0 | 3+ | 1 | 8 |
| 2 | 0 | 0 | 2 | 1 | 7 |
| 2 | 0 | 1 | 3+ | 1 | 9 |
| 2 | 1 | 0 | 3 | 1 | 9 |
| 2 | 1 | 1 | 4+ | 1 | 10 |
| 2 | 2 | 0 | 4 | 2 | 10 |
| 2 | 3 | 0 | 5+ | 2 | 12 |
| 3 | 0 | 0 | 3 | 1 | 9 |
| 3 | 0 | 1 | 4 | 2 | 11 |
| 3 | 1 | 0 | 4 | 2 | 11 |
| 3 | 1 | 1 | 5+ | 2 | 13 |
| 3 | 2 | 0 | 5 | 2 | 13 |
| 3 | 2 | 1 | 6+ | 3 | 14 |
| 3 | 3 | 0 | 6+ | 3 | 14 |
| 4 | 0 | 0 | 4 | 2 | 12 |
| 4 | 0 | 1 | 6 | 2 | 13 |
| 4 | 1 | 0 | 6 | 2 | 14 |
| 4 | 1 | 1 | 7 | 3 | 15 |
| 4 | 2 | 0 | 7 | 3 | 15 |
| 4 | 2 | 1 | 8 | 4 | 17 |
| 4 | 3 | 0 | 8 | 4 | 17 |
| 4 | 4 | 0 | 9+ | 5 | 19 |
| 5 | 0 | 0 | 6 | 2 | 15 |
| 5 | 0 | 1 | 7 | 3 | 16 |
| 5 | 1 | 0 | 7 | 3 | 17 |
| 5 | 1 | 1 | 9 | 4 | 18 |
| 5 | 2 | 0 | 9 | 4 | 18 |
| 5 | 2 | 1 | 10+ | 5 | 20 |
| 5 | 3 | 0 | 10 | 5 | 20 |
| 5 | 3 | 1 | 11+ | 6 | 22 |
| 5 | 4 | 0 | 11+ | 6 | 22 |
| 6 | 0 | 0 | 8 | 3 | 18 |
| 6 | 0 | 1 | 9 | 4 | 20 |
| 6 | 1 | 0 | 9 | 4 | 20 |
| 6 | 1 | 1 | 11 | 5 | 22 |
| 6 | 2 | 0 | 11 | 5 | 22 |
| 6 | 2 | 1 | 12 | 6 | 24 |
| 6 | 3 | 0 | 12 | 6 | 25 |
| 6 | 3 | 1 | 14+ | 7 | 27 |
| 6 | 4 | 0 | 14+ | 7 | 27 |
| 6 | 5 | 0 | 15+ | 8 | 29 |
| 7 | 0 | 0 | 10 | 5 | 22 |
| 7 | 0 | 1 | 12 | 6 | 24 |
| 7 | 0 | 2 | 13+ | 7 | 27 |
| 7 | 1 | 0 | 12 | 6 | 25 |
| 7 | 1 | 1 | 13 | 7 | 27 |
| 7 | 1 | 2 | 15+ | 8 | 30 |
| 7 | 2 | 0 | 13 | 7 | 27 |
| 7 | 2 | 1 | 15 | 8 | 30 |
| 7 | 2 | 2 | 17+ | 9 | 32 |
| 7 | 3 | 0 | 15 | 8 | 30 |
| 7 | 3 | 1 | 17 | 9 | 33 |
| 7 | 4 | 0 | 17 | 9 | 33 |
| 7 | 4 | 1 | 19+ | 10 | 36 |
| 7 | 5 | 0 | 19+ | 10 | 36 |
| 8 | 0 | 0 | 13 | 6 | 28 |
| 8 | 0 | 1 | 15 | 7 | 31 |
| 8 | 0 | 2 | 17+ | 8 | 34 |
| 8 | 1 | 0 | 15 | 7 | 31 |
| 8 | 1 | 1 | 17 | 9 | 34 |
| 8 | 1 | 2 | 19+ | 10 | 37 |
| 8 | 2 | 0 | 17 | 9 | 35 |
| 8 | 2 | 1 | 19 | 10 | 38 |
| 8 | 2 | 2 | 21+ | 12 | 42 |
| 8 | 3 | 0 | 19 | 10 | 39 |
| 8 | 3 | 1 | 21 | 12 | 42 |
| 8 | 3 | 2 | 24+ | 13 | 46 |
| 8 | 4 | 0 | 22 | 12 | 43 |
| 8 | 4 | 1 | 24 | 13 | 46 |
| 8 | 5 | 0 | 24 | 13 | 47 |
| 8 | 5 | 1 | 27+ | 15 | 51 |
| 8 | 6 | 0 | 27+ | 15 | 52 |
| 9 | 0 | 0 | 17 | 8 | 37 |
| 9 | 0 | 1 | 19 | 10 | 41 |
| 9 | 0 | 2 | 22+ | 11 | 46 |
| 9 | 1 | 0 | 19 | 10 | 42 |
| 9 | 1 | 1 | 22 | 11 | 47 |
| 9 | 1 | 2 | 25+ | 13 | 52 |
| 9 | 2 | 0 | 22 | 12 | 47 |
| 9 | 2 | 1 | 25 | 13 | 53 |
| 9 | 2 | 2 | 28+ | 15 | 58 |
| 9 | 3 | 0 | 25 | 13 | 54 |
| 9 | 3 | 1 | 29 | 15 | 60 |
| 9 | 3 | 2 | 32+ | 18 | 66 |
| 9 | 4 | 0 | 29 | 16 | 61 |
| 9 | 4 | 1 | 33 | 18 | 67 |
| 9 | 4 | 2 | 37+ | 20 | 74 |
| 9 | 5 | 0 | 33 | 18 | 69 |
| 9 | 5 | 1 | 37 | 20 | 76 |
| 9 | 5 | 2 | 42+ | 23 | 83 |
| 9 | 6 | 0 | 38 | 21 | 77 |
| 9 | 6 | 1 | 43+ | 24 | 85 |
| 9 | 7 | 0 | 44+ | 24 | 87 |
| 10 | 0 | 0 | 23 | 12 | 58 |
| 10 | 0 | 1 | 27 | 14 | 67 |
| 10 | 0 | 2 | 31+ | 16 | 77 |
| 10 | 1 | 0 | 27 | 14 | 69 |
| 10 | 1 | 1 | 32 | 17 | 79 |
| 10 | 1 | 2 | 38 | 20 | 92 |
| 10 | 2 | 0 | 33 | 17 | 83 |
| 10 | 2 | 1 | 39 | 20 | 96 |
| 10 | 2 | 2 | 50 | 20 | 110 |
| 10 | 2 | 3 | 50+ | 30 | 120 |
| 10 | 3 | 0 | 40 | 20 | 100 |
| 10 | 3 | 1 | 50 | 20 | 120 |
| 10 | 3 | 2 | 60+ | 30 | 130 |
| 10 | 3 | 3 | 70+ | 30 | 150 |
| 10 | 4 | 0 | 50 | 30 | 120 |
| 10 | 4 | 1 | 60 | 30 | 140 |
| 10 | 4 | 2 | 70 | 30 | 160 |
| 10 | 4 | 3 | 80+ | 40 | 170 |
| 10 | 5 | 0 | 60 | 30 | 150 |
| 10 | 5 | 1 | 70 | 40 | 170 |
| 10 | 5 | 2 | 90 | 40 | 190 |
| 10 | 5 | 3 | 100 | 50 | 210 |
| 10 | 6 | 0 | 80 | 40 | 180 |
| 10 | 6 | 1 | 90 | 50 | 200 |
| 10 | 6 | 2 | 110 | 50 | 230 |
| 10 | 6 | 3 | 120 | 60 | 250 |
| 10 | 6 | 4 | 140+ | 70 | 270 |
| 10 | 7 | 0 | 100 | 50 | 220 |
| 10 | 7 | 1 | 120 | 60 | 250 |
| 10 | 7 | 2 | 140 | 70 | 280 |
| 10 | 7 | 3 | 150 | 80 | 310 |
| 10 | 7 | 4 | 170+ | 90 | 340 |
| 10 | 8 | 0 | 130 | 60 | 280 |
| 10 | 8 | 1 | 150 | 80 | 320 |
| 10 | 8 | 2 | 170 | 90 | 360 |
| 10 | 8 | 3 | 200 | 100 | 400 |
| 10 | 8 | 4 | 220 | 120 | 440 |
| 10 | 8 | 5 | 250+ | 140 | 480 |
| 10 | 9 | 0 | 170 | 90 | 380 |
| 10 | 9 | 1 | 200 | 100 | 430 |
| 10 | 9 | 2 | 230 | 120 | 490 |
| 10 | 9 | 3 | 260 | 140 | 560 |
| 10 | 9 | 4 | 300 | 160 | 640 |
| 10 | 9 | 5 | 350 | 180 | 720 |
| 10 | 9 | 6 | 400+ | 210 | 820 |
| 10 | 10 | 0 | 240 | 120 | 610 |
| 10 | 10 | 1 | 290 | 150 | 750 |
| 10 | 10 | 2 | 350 | 170 | 910 |
| 10 | 10 | 3 | 400 | 200 | 1100 |
| 10 | 10 | 4 | 500 | 300 | 1400 |
| 10 | 10 | 5 | 700 | 300 | 1700 |
| 10 | 10 | 6 | 900 | 400 | 2100 |
| 10 | 10 | 7 | 1120 | 600 | 2700 |
| 10 | 10 | 8 | 1160 | 800 | 3700 |
| 10 | 10 | 9 | 2300 | 1100 | 6000 |
| 10 | 10 | 10 | 2300 | - | - |

a Los resultados normales, obtenidos en un 95% de las pruebas, no están seguidos por un símbolo más (+). Menos del 4% de los resultados de las pruebas obtenidos están marcados por un símbolo más(+). Combinaciones de tubos positivos no encontrados en esta tabla se presentan en menos del 1% de las pruebas y si se presentaran con mayor frecuencia indican un error detécnica o que el valor del número más probable se encuentra en el límite. El NMP de combinaciones que no aparecen en la tabla, se pueden obtener por extrapolación a la combinación cercana más elevada.

b Multiplicar todos los valores de NMP/g (ml) por 100 para expresarlos como NMP/100 g (ml).

**Tabla No. 4 Número más probable (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 | 0,01 | 0,001 | NMP | 0,1 | 0,01 | 0,001 | NMP | 0,1 | 0,01 | 0,001 | NMP | 0,1 | 0,01 | 0,001 | NMP |
| 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 3,6 | 2 | 0 | 0 | 9,1 | 3 | 0 | 0 | 23 |
| 0 | 0 | 1 | 3 | 1 | 0 | 1 | 7,2 | 2 | 0 | 1 | 14 | 3 | 0 | 1 | 39 |
| 0 | 0 | 2 | 6 | 1 | 0 | 2 | 11 | 2 | 0 | 2 | 20 | 3 | 0 | 2 | 64 |
| 0 | 0 | 3 | 9 | 1 | 0 | 3 | 15 | 2 | 0 | 3 | 26 | 3 | 0 | 3 | 95 |
| 0 | 1 | 0 | 3 | 1 | 1 | 0 | 7,3 | 2 | 1 | 0 | 15 | 3 | 1 | 0 | 43 |
| 0 | 1 | 1 | 6,1 | 1 | 1 | 1 | 11 | 2 | 1 | 1 | 20 | 3 | 1 | 1 | 75 |
| 0 | 1 | 2 | 9,2 | 1 | 1 | 2 | 15 | 2 | 1 | 2 | 27 | 3 | 1 | 2 | 120 |
| 0 | 1 | 3 | 12 | 1 | 1 | 3 | 19 | 2 | 1 | 3 | 34 | 3 | 1 | 3 | 160 |
| 0 | 2 | 0 | 6,2 | 1 | 2 | 0 | 11 | 2 | 2 | 0 | 21 | 3 | 2 | 0 | 93 |
| 0 | 2 | 1 | 9,3 | 1 | 2 | 1 | 15 | 2 | 2 | 1 | 28 | 3 | 2 | 1 | 150 |
| 0 | 2 | 2 | 12 | 1 | 2 | 2 | 20 | 2 | 2 | 2 | 35 | 3 | 2 | 2 | 210 |
| 0 | 2 | 3 | 16 | 1 | 2 | 3 | 24 | 2 | 2 | 3 | 42 | 3 | 2 | 3 | 290 |
| 0 | 3 | 0 | 9,4 | 1 | 3 | 0 | 16 | 2 | 3 | 0 | 29 | 3 | 3 | 0 | 240 |
| 0 | 3 | 1 | 13 | 1 | 3 | 1 | 20 | 2 | 3 | 1 | 36 | 3 | 3 | 1 | 460 |
| 0 | 3 | 2 | 16 | 1 | 3 | 2 | 24 | 2 | 3 | 2 | 44 | 3 | 3 | 2 | 1100 |
| 0 | 3 | 3 | 19 | 1 | 3 | 3 | 29 | 2 | 3 | 3 | 53 | 3 | 3 | 3 | 1100 |

**Tabla No. 5 Número más probable (NMP) para 100 ml 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 | | | |
| 10 1 0,1 | | | | 10 1 0,1 | | | | 10 1 0,1 | | | | 10 1 0,1 | | | | 10 1 0,1 | | | | 10 1 0,1 | | | |
| ml | ml | ml | N M P | ml | ml | ml | N M P | ml | ml | ml | N M P | ml | ml | ml | N M P | ml | ml | ml | N M P | ml | ml | ml | N M P |
| 0 | 0 | 0 |  | 1 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 4,5 | 3 | 0 | 0 | 7,8 | 4 | 0 | 0 | 13 | 5 | 0 | 0 | 23 |
| 0 | 0 | 1 | 1,8 | 1 | 0 | 1 | 4 | 2 | 0 | 1 | 6,8 | 3 | 0 | 1 | 11 | 4 | 0 | 1 | 17 | 5 | 0 | 1 | 31 |
| 0 | 0 | 2 | 3,6 | 1 | 0 | 2 | 6 | 2 | 0 | 2 | 9,1 | 3 | 0 | 2 | 13 | 4 | 0 | 2 | 21 | 5 | 0 | 2 | 43 |
| 0 | 0 | 3 | 5,4 | 1 | 0 | 3 | 8 | 2 | 0 | 3 | 12 | 3 | 0 | 3 | 16 | 4 | 0 | 3 | 25 | 5 | 0 | 3 | 58 |
| 0 | 0 | 4 | 7,2 | 1 | 0 | 4 | 10 | 2 | 0 | 4 | 14 | 3 | 0 | 4 | 20 | 4 | 0 | 4 | 30 | 5 | 0 | 4 | 76 |
| 0 | 0 | 5 | 9,0 | 1 | 0 | 5 | 12 | 2 | 0 | 5 | 16 | 3 | 0 | 5 | 23 | 4 | 0 | 5 | 36 | 5 | 0 | 5 | 95 |
| 0 | 1 | 0 | 1,8 | 1 | 1 | 0 | 4 | 2 | 1 | 0 | 6,8 | 3 | 1 | 0 | 11 | 4 | 1 | 0 | 17 | 5 | 1 | 0 | 33 |
| 0 | 1 | 1 | 3,6 | 1 | 1 | 1 | 6,1 | 2 | 1 | 1 | 9,2 | 3 | 1 | 1 | 14 | 4 | 1 | 1 | 21 | 5 | 1 | 1 | 46 |
| 0 | 1 | 2 | 5,5 | 1 | 1 | 2 | 8,1 | 2 | 1 | 2 | 12 | 3 | 1 | 2 | 17 | 4 | 1 | 2 | 26 | 5 | 1 | 2 | 64 |
| 0 | 1 | 3 | 7,3 | 1 | 1 | 3 | 10 | 2 | 1 | 3 | 14 | 3 | 1 | 3 | 20 | 4 | 1 | 3 | 31 | 5 | 1 | 3 | 84 |
| 0 | 1 | 4 | 9,1 | 1 | 1 | 4 | 12 | 2 | 1 | 4 | 17 | 3 | 1 | 4 | 23 | 4 | 1 | 4 | 35 | 5 | 1 | 4 | 110 |
| 0 | 1 | 5 | 11 | 1 | 1 | 5 | 14 | 2 | 1 | 5 | 19 | 3 | 1 | 5 | 27 | 4 | 1 | 5 | 42 | 5 | 1 | 5 | 130 |
| 0 | 2 | 0 | 3,7 | 1 | 2 | 0 | 6,1 | 2 | 2 | 0 | 9,3 | 3 | 2 | 0 | 14 | 4 | 2 | 0 | 22 | 5 | 2 | 0 | 49 |
| 0 | 2 | 1 | 5,5 | 1 | 2 | 1 | 8,2 | 2 | 2 | 1 | 12 | 3 | 2 | 1 | 17 | 4 | 2 | 1 | 26 | 5 | 2 | 1 | 70 |
| 0 | 2 | 2 | 7,4 | 1 | 2 | 2 | 10 | 2 | 2 | 2 | 14 | 3 | 2 | 2 | 20 | 4 | 2 | 2 | 32 | 5 | 2 | 2 | 95 |
| 0 | 2 | 3 | 9,2 | 1 | 2 | 3 | 12 | 2 | 2 | 3 | 17 | 3 | 2 | 3 | 24 | 4 | 2 | 3 | 38 | 5 | 2 | 3 | 120 |
| 0 | 2 | 4 | 11 | 1 | 2 | 4 | 15 | 2 | 2 | 4 | 19 | 3 | 2 | 4 | 27 | 4 | 2 | 4 | 44 | 5 | 2 | 4 | 150 |
| 0 | 2 | 5 | 13 | 1 | 2 | 5 | 17 | 2 | 2 | 5 | 22 | 3 | 2 | 5 | 31 | 4 | 2 | 5 | 50 | 5 | 2 | 5 | 180 |
| 0 | 3 | 0 | 5,6 | 1 | 3 | 0 | 8,3 | 2 | 3 | 0 | 12 | 3 | 3 | 0 | 17 | 4 | 3 | 0 | 27 | 5 | 3 | 0 | 79 |
| 0 | 3 | 1 | 7,4 | 1 | 3 | 1 | 10 | 2 | 3 | 1 | 14 | 3 | 3 | 1 | 21 | 4 | 3 | 1 | 33 | 5 | 3 | 1 | 110 |
| 0 | 3 | 2 | 9,3 | 1 | 3 | 2 | 13 | 2 | 3 | 2 | 17 | 3 | 3 | 2 | 24 | 4 | 3 | 2 | 39 | 5 | 3 | 2 | 140 |
| 0 | 3 | 3 | 11 | 1 | 3 | 3 | 15 | 2 | 3 | 3 | 20 | 3 | 3 | 3 | 28 | 4 | 3 | 3 | 45 | 5 | 3 | 3 | 180 |
| 0 | 3 | 4 | 13 | 1 | 3 | 4 | 17 | 2 | 3 | 4 | 22 | 3 | 3 | 4 | 31 | 4 | 3 | 4 | 52 | 5 | 3 | 4 | 210 |
| 0 | 3 | 5 | 15 | 1 | 3 | 5 | 19 | 2 | 3 | 5 | 25 | 3 | 3 | 5 | 35 | 4 | 3 | 5 | 59 | 5 | 3 | 5 | 250 |
| 0 | 4 | 0 | 7,5 | 1 | 4 | 0 | 11 | 2 | 4 | 0 | 15 | 3 | 4 | 0 | 21 | 4 | 4 | 0 | 34 | 5 | 4 | 0 | 130 |
| 0 | 4 | 1 | 9,4 | 1 | 4 | 1 | 13 | 2 | 4 | 1 | 17 | 3 | 4 | 1 | 24 | 4 | 4 | 1 | 40 | 5 | 4 | 1 | 170 |
| 0 | 4 | 2 | 11 | 1 | 4 | 2 | 15 | 2 | 4 | 2 | 20 | 3 | 4 | 2 | 28 | 4 | 4 | 2 | 47 | 5 | 4 | 2 | 220 |
| 0 | 4 | 3 | 13 | 1 | 4 | 3 | 17 | 2 | 4 | 3 | 23 | 3 | 4 | 3 | 32 | 4 | 4 | 3 | 54 | 5 | 4 | 3 | 280 |
| 0 | 4 | 4 | 15 | 1 | 4 | 4 | 19 | 2 | 4 | 4 | 25 | 3 | 4 | 4 | 36 | 4 | 4 | 4 | 62 | 5 | 4 | 4 | 350 |
| 0 | 4 | 5 | 17 | 1 | 4 | 5 | 22 | 2 | 4 | 5 | 28 | 3 | 4 | 5 | 40 | 4 | 4 | 5 | 69 | 5 | 4 | 5 | 430 |
| 0 | 5 | 0 | 9,4 | 1 | 5 | 0 | 13 | 2 | 5 | 0 | 17 | 3 | 5 | 0 | 25 | 4 | 5 | 0 | 41 | 5 | 5 | 0 | 240 |
| 0 | 5 | 1 | 11 | 1 | 5 | 1 | 15 | 2 | 5 | 1 | 20 | 3 | 5 | 1 | 29 | 4 | 5 | 1 | 48 | 5 | 5 | 1 | 350 |
| 0 | 5 | 2 | 13 | 1 | 5 | 2 | 17 | 2 | 5 | 2 | 23 | 3 | 5 | 2 | 32 | 4 | 5 | 2 | 56 | 5 | 5 | 2 | 540 |
| 0 | 5 | 3 | 15 | 1 | 5 | 3 | 19 | 2 | 5 | 3 | 26 | 3 | 5 | 3 | 37 | 4 | 5 | 3 | 64 | 5 | 5 | 3 | 920 |
| 0 | 5 | 4 | 17 | 1 | 5 | 4 | 22 | 2 | 5 | 4 | 29 | 3 | 5 | 4 | 41 | 4 | 5 | 4 | 72 | 5 | 5 | 4 | 1600 |
| 0 | 5 | 5 | 19 | 1 | 5 | 5 | 24 | 2 | 5 | 5 | 32 | 3 | 5 | 5 | 45 | 4 | 5 | 5 | 81 |  |  |  |  |

**Tabla No. 6 Ejemplos para determinar el NMP estimado en series de tres tubos con 1g (ml) de muestra por tubo.**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Cantidad de muestra (g o ml) | | | Valores positivos reportados | | | NMP estimado/g o mlb |
| Ejemplo | 0,10 | ,001 | 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).

**Tabla No. 7 Ejemplos para determinar el NMP estimado en series de 5 tubos con 1 g (ml) de muestra por tubo.**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Cantidad de muestra (g o ml) | | | Valores positivos | | | NMP estimado/g o mlb |
| Ejemplo | 0,1, | 0,01 | 0,001 | 0,0001 | 0,00001 | reportados |  |
| 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 | 20 |
| D | 5/5 | 5/5 | 3/5 | 1/5 | 1/5 | 5-2-2 | 1400 |
| E | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 5-5-5 | 160000 |

a Numerador/denominador = número de tubos positivos/número de tubos inoculados.

b Multiplicar todos los valores de NMP/g (ml) por 100 para expresarlos como NMP/100 g (ml).

**B.17.3.3** **Determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* por la técnica de diluciones en tubo múltiple.**

**B.17.3.3.1 Fundamento**

Este método se basa en la propiedad de los microorganismos coliformes para producir gas a partir de glucosa y fermentación de lactosa dentro de las 48 horas de incubación a 35 0,5°C (coliformes) y 44,50,2°C (coliformes fecales y *E. coli***).**

**B.17.3.3.2** **Equipo y materiales**

Además de los mencionados en el método Preparación y dilución de muestras de alimentos para análisis microbiológico, lo siguiente:

Baño de agua con agitación continua cubierto y con termostato que evite variaciones mayores a 0,1°C.

Termómetro calibrado y verificado 1/10

Tubos de cultivo de 20x200 y de 16x160 mm con tapón de rosca

Campanas de fermentación (tubos de Durham)

Gradillas

Asas bacteriológicas de 3 mm de diámetro

Lámpara de luz ultravioleta de longitud amplia 4 watts.

Lentes protectores.

Medios de cultivo

**Caldo lauril**

**Ingredientes:**

|  |  |
| --- | --- |
| Bacto triptosa | 20,0 g |
| Bacto lactosa | 5,0 g |
| Fosfato potásico, dibásico | 2,75 g |
| Fosfato potásico, monobásico | 2,75 g |
| Cloruro de sodio | 5,0 g |
| Lauril sulfato de sodio | 0,1 g |
| Agua destilada | 1000,0 ml |

pH final: 6,8 0,2 a 25°C.

**Preparación:** Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Ajustar el pH. Distribuir en tubos de ensaye con campanas de Durham. Adicionar 10 ml de medio para cada tubo. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121C. Antes de abrir el autoclave, dejar bajar la temperatura a 75C para que no queden burbujas en las campanas de Durham.

Preparación de caldo lauril triptosa

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **INOCULO (ml)** | **CANTIDAD DE MEDIO POR TUBO (ml)** | **VOLUMEN DE MEDIO MAS INOCULO (ml)** | **CALDO LAURIL TRIPTOSA REQUERIDO g/L** |
| 1 | 10 o más | 11 o más | 35,6 |
| 10 | 10 | 20 | 71,2 |
| 10 | 20 | 30 | 53,4 |
| 20 | 10 | 30 | 106,8 |
| 100 | 50 | 150 | 106,8 |
| 100 | 35 | 135 | 137,1 |
| 100 | 20 | 120 | 213,6 |

**Caldo EC (*E. coli*.)**

|  |  |
| --- | --- |
| **Ingredientes:** |  |
| Bacto triptosa | 20,0 g |
| Bacto lactosa | 5,0 g |
| Bacto sales biliares No. 3 | 1,5 g |
| Fosfato dipotásico | 4,0 g |
| Fosfato monopotásico | 1,5 g |
| Cloruro de sodio | 5,0 g |
| Agua destilada | 1000,0 ml |

pH final: 6,9 0,2 a 25°C.

**Preparación:** Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada y calentar ligeramente para que se disuelva por completo. Ajustar el pH. Distribuir en tubos de ensaye con campanas de Durham. Adicionar 10 ml de medio para cada tubo. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Antes de abrir el autoclave, dejar bajar la temperatura a 75°C para evitar que queden burbujas en las campanas de Durham.

**Agar McConkey**

|  |  |
| --- | --- |
| **Ingredientes:** |  |
| Proteasa peptona o polipeptona | 3,0 g |
| Peptona o gelizante | 17,0 g |
| Lactosa | 10,0 g |
| Sales biliares No. 3 | 1,5 g |
| Cloruro de sodio | 5,0 g |
| Rojo neutro | 0,03 g |
| Cristal violeta | 0,001 g |
| Agar | 13,5 g |
| Agua destilada | 1000,0 ml |

pH final: 7,1 0,2 a 25°C

**Preparación:** Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Calentar hasta ebullición para disolver por completo. Ajustar el pH. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 50-60°C y vaciar en cajas Petri.

**Agar eosina azul de metileno de Levin (EMB-L)**

|  |  |
| --- | --- |
| **Ingredientes:** |  |
| Peptona | 10,0 g |
| Lactosa | 10,0 g |
| K2HPO4 | 2,0 g |
| Eosina Y | 0,4 g |
| Azul de metileno | 0,065 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

pH final: 7,1 0,2

**Preparación:** Disolver la peptona, el fosfato y el agar en un litro de agua. Calentar hasta ebullición para la disolución completa. Distribuir en porciones de 100 o 200 ml y esterilizar a no más de 121°C por 15 minutos. Fundir antes de su uso y adicionar a cada porción de 100 ml.

a) 5 ml de solución de lactosa al 20%

b) 2 ml de solución acuosa de eosina al 2%

c) 4,3 ml 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.

**Caldo triptona al 1% (triptofano)**

|  |  |
| --- | --- |
| **Ingredientes:** |  |
| Triptona o tripticasa | 10 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

pH final: 6,9 0,2

**Preparación:** Disolver los ingredientes. Distribuir en porciones de 5 ml en tubos de ensaye de 16 x 125 o 16 x 150 mm. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

**Caldo MR-VP**

Medio 1

|  |  |
| --- | --- |
| **Ingredientes:** |  |
| Peptona tamponada | 7 g |
| Glucosa | 5 g |
| K2HPO4 | 5 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

pH final: 6,9 0,2

**Preparación:** Disolver los ingredientes con calentamiento suave si es necesario. Distribuir en volúmenes de 10 ml en tubos de ensaye de 16x150 mm. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

**Caldo citrato de Koser**

|  |  |
| --- | --- |
| **Ingredientes:** |  |
| NaNH4HPO4 •4H2O | 1,5 g |
| KH2PO4 (monobásico) | 1,0 g |
| MgSO4 •7H2O | 0,2 g |
| Citrato de sodio•2H2O | 3,0 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

pH final: 6,7 0,2.

**Preparación:** Distribuir preferentemente en tubos de ensaye con tapa de rosca. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. 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). Este difiere de la composición del medio deshidratado disponible comercialmente y es recomendable su uso.

**Reactivos**

**Reactivo de Kovacs**

|  |  |
| --- | --- |
| **Ingredientes:** |  |
| p-imetilaminobenzaldehído | 5 g |
| Alcohol amílico (normal) | 75 ml |
| HCI concentrado | 25 ml |

**Preparación:** Disolver el p-Dimetilaminobenzaldehído en alcohol amílico normal. Adicionar lentamente el HCl. Almacenar a 4°C.

**Para la prueba de indol**

1. Adicionar 0,2-0,3 ml del reactivo a 5 ml del cultivo de bacteria en caldo triptona.

Se considera una prueba positiva cuando desarrolla un color rojo en la superficie del tubo.

Reactivo de Voges-Proskauer (VP)

Solución 1

|  |  |
| --- | --- |
| **Ingredientes:** |  |
| alfa-naftol | 5 g |
| Alcohol absoluto | 100 g |

Solución 2

|  |  |
| --- | --- |
| **Ingredientes:** |  |
| Hidróxido de potasio | 40 g |
| Agua destilada | para llevar a 100 ml |

**Prueba de Voges-Proskauer (VP).**

1. Transferir 1 ml del cultivo a probar con 48 horas de incubación a un tubo de ensaye.

2. Adicionar 0,6 ml de la solución 1 y 0,2 ml de la solución 2.

3. Agitar después de la adición de cada solución.

4. Para intensificar y acelerar la reacción adicionar unos cuantos cristales de creatina y mezclar.

5. Dejar a temperatura ambiente.

6. Leer resultados después de 4 horas de adicionar los reactivos.

El desarrollo de una coloración rosa es una prueba positiva.

**Reactivos para la coloración de Gram**

**Cristal violeta**

|  |  |
| --- | --- |
| **Solución A** |  |
| Cristal violeta (colorante 90%) | 2 g |
| Etanol 95% | 20 ml |

**Solución B**

|  |  |
| --- | --- |
| Oxalato de amonio | 0,8 g |
| Agua destilada | 80 ml |

**Indicador rojo de metilo (R44)**

1. Mezclar la solución A y B. Almacenar por 24 horas

2. Filtrar a través de un papel filtro áspero.

lodo de Gram

|  |  |
| --- | --- |
| **Ingredientes:** |  |
| lodo | 1g |
| Ioduro de potasio (Kl) | 2 g |
| Agua destilada | 300 ml |

1. Colocar el Kl en un mortero.

2. Adicionar el yodo.

3. Triturar con el pistilo por 5-10 segundos.

4. Adicionar 1 ml de agua y triturar

5. Adicionar 5 ml de agua y triturar

6. Adicionar 10 ml de agua y triturar

7. Vaciar esta solución en una botella de reactivo.

8. Enjuagar el mortero y el pistilo con la cantidad de agua necesaria para completar 300 ml.

Colorante de contraste (solución concentrada)

|  |  |
| --- | --- |
| **Ingredientes:** |  |
| Safranina O | 2,5 g |
| Etanol al 95% | 100 ml |

Solución de trabajo: Adicionar 10 ml de la solución concentrada a 90 ml de agua destilada.

Procedimiento para la tinción de Gram

1. Fijar con calor moderado los frotis de la muestra a teñir.

2. Adicionar la solución de cristal violeta al frotis.

3. Dejar actuar por un minuto.

4. Lavar con agua corriente y escurrir.

5. Aplicar la solución de yodo por un minuto.

6. Lavar con agua corriente y escurrir.

7. Decolorar con etanol al 95% hasta que la coloración azul deje de fluir (aproximadamente 30 segundos).

8. Inmediatamente después enjuagar con agua corriente

9. Escurrir.

10. Aplicar el colorante de contraste (safranina) por 30 segundos.

11. Enjuagar, escurrir y secar al aire. Examinar al microscopio.

**Medio EC-MUG**

Preparar el caldo EC y adicionar 50 mg de 4-metilumbelliferyl-beta-D-glucurónido (MUG) por litro antes de esterilizar (121°C por 15 minutos). El caldo EC-MUG está comercialmente disponible.

**B.17.3.3.3** Procedimiento

**B.17.3.3.3.1** Alimentos

**B.17.3.3.3.1.1** Prueba presuntiva.

**B.17.3.3.3.1.1.1** Preparar la muestra como se indica en el método Preparación y dilución de muestras de alimentos para análisis microbiológico; y de acuerdo con el tipo de producto, utilizar las diluciones apropiadas, según se indica en el procedimiento de la densidad microbiana por la técnica del número más probable.

Utilizar como medio de enriquecimiento caldo lauril triptosa y continuar como en el punto B.17.3.3.3.1.1.2

**B.17.3.3.3.1.2** Prueba confirmativa. Continuar como en el punto B.17.3.3.3.1.2

**B.17.3.3.3.3**Prueba confirmatoria.

Confirmar la presencia de *Escherichia coli* en por lo menos el 10% de las pruebas con resultados positivos a coliformes fecales por cultivo en placas de agar McConkey a partir de los tubos que demostraron la presencia de gas en la prueba confirmativa. Incubar las placas a 35±0,5°C durante 24±2 horas, observar las colonias típicas fermentadoras de color rojo rodeadas de un halo opaco de precipitación de sales biliares. Seleccionar 1 o más colonias aisladas y pasar a tubos de fermentación con caldo lauril triptosa, continuar como se indica en el punto B.16.3.3.3.1.1 Hacer tinción de Gram para observación de la morfología de las colonias.

**B.17.3.3.3.3.1 Interpretación de resultados.**

La formación de gas en el tubo de fermentación secundario dentro de las 48±3 horas y la demostración de bacilos Gram (-) no esporulados confirma un resultado positivo de la prueba demostrándose la presencia del grupo coliforme.

**B.17.3.3.3.4 Cálculos**

Calcular la densidad microbiana en número más probable conforme al procedimiento señalado anteriormente, para estimar la población de bacterias coliformes y bacterias coliformes fecales de acuerdo con las diluciones empleadas y expresar en NMP/g o ml para alimentos y NMP/100 ml para agua. En el caso de usar volúmenes de 20 ml de muestras de agua en 5 tubos o 10 ml de muestras de agua en 10 tubos, utilizar las siguientes tablas:

**TABLA 1. Indice del NMP con 95% de límite de confianza para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan 5 tubos con 20 ml de muestra de agua o hielo.**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **No. de Tubos Positivos** | **NMP/100 ml** | **95% de LImite de Confianza (aproximado)** | |
| **Inferior** | **Superior** |
| 0 | 1,1 | 0 | 3,0 |
| 1 | 1,1 | 0,05 | 6,3 |
| 2 | 2,6 | 0,3 | 9,6 |
| 3 | 4,6 | 0,8 | 14,7 |
| 4 | 8,0 | 1,7 | 26,4 |
| 5 | 8,0 | 4,0 | Infinito |

**TABLA 2. Indice del NMP con 95% de límite de confianza para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan 10 tubos con 10 ml de muestra de agua o hielo.**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **No. de Tubos Positivos** | **NMP/100 ml** | **95% de Límite de Confianza (aproximado)** | |
|  |  | **Inferior** | **Superior** |
| 0 | 1,1 | 0,0 | 3,0 |
| 1 | 1,1 | 0,03 | 5,9 |
| 2 | 2,2 | 0,26 | 8,1 |
| 3 | 3,6 | 0,69 | 10,6 |
| 4 | 5,1 | 1,3 | 13,4 |
| 5 | 6,9 | 2,1 | 16,8 |
| 6 | 9,2 | 3,1 | 21,1 |
| 7 | 12,0 | 4,3 | 27,1 |
| 8 | 16,1 | 5,9 | 36,8 |
| 9 | 23,0 | 8,1 | 59,5 |
| 10 | 23,0 | 13,5 | Infinito |

**B.18. PREPARACION DE LA MUESTRA PARA LA DETERMINACION DE *VIBRIO CHOLERAE.***

Las submuestras de pescado ahumado en filete deben analizarse individualmente.

**B.18.1** Incubación de las muestras a 35-37°C.

De cada submuestra tomar 25 g, cortar en piezas pequeñas e introducirlas en un vaso de licuadora de 500 ml de capacidad que contenga 225 ml de agua peptonada alcalina (APW) y homogeneizar por 2 min a la máxima velocidad. Esta es la dilución 1:10. De esta dilución preparar la dilución 1:100 y 1:1000, en 9 o 90 ml de agua peptonada alcalina.

Incubar las tres diluciones de 35 a 37°C.

**B.18.2** Incubación de las muestras de 35-37°C y 42°C.

Si se van a incubar los enriquecimientos a dos temperaturas para una muestra, homogeneizar una porción de 50 g de cada submuestra en 450 ml de agua peptonada alcalina (APW). Esto hace la dilución 1:10. Verter 250 ml (g) de la dilución 1:10 a un segundo recipiente estéril. Prepare dos series de diluciones de 1:100 y 1:1000. Por lo tanto tenemos dos series de 3 diluciones. Incubar una serie de 35 a 37°C y la otra a 42°C. Proseguir con el paso de resiembra marcado en la NOM-031-SSA1-1993. Productos de la pesca. Moluscos bivalvos frescos-refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias.

**B.19. TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS PARA LA INVESTIGACION DE *VIBRIO CHOLERAE***

**B.19.1 Material y equipo**

Licuadora y vasos de licuadora estériles.

Frascos de vidrio de boca ancha tipo tarro de 500 ml de capacidad con tapa de rosca.

Varilla de vidrio de 3 mm de diámetro y 20 cm de largo, con un doblez terminal en ángulo recto de 4 cm.

Balanza granataria de 2000 g de capacidad y 0,2 g de sensibilidad.

Balanza analítica de 120 g de capacidad y 5 mg de sensibilidad.

Incubadoras de 39-40°C.

Baño de agua de 42 ± 0,2°C y 35-37°C.

Cucharas estériles u otros instrumentos apropiados para transferir muestras de alimentos.

Cajas Petri estériles de 15 x 100 mm de plástico.

Pipetas estériles de 1 ml con graduación de 0,01 ml, de 5 y 10 ml con graduación de 0,1 ml.

Asas bacteriológicas de 3 mm de diámetro de nicromel o platino.

Tubos de cultivo o de ensayo de 16 x 150 mm y 20 x 150 mm.

Tubos para bioquímicas o ensaye de 10 x 75 mm o 13 x 100 mm.

Tijeras y pinzas estériles.

Lámpara (para observar reacciones serológicas).

Mecheros.

Papel pH (rango 1-14) con un máximo de graduación de 0,4 unidades de pH por cambio de color.

Potenciómetro.

Bolsas de polietileno de 28 x 37 cm con tapa resellable.

Aparato de filtración y membranas de 0,45 micras.

**B.19.1.1 Medios de cultivo**

**Agua Peptonada Alcalina (APW)**

**FORMULA**

|  |  |
| --- | --- |
| Peptona. | 10 g |
| Cloruro de Sodio | 10 g |
| Agua destilada | 1 000 ml |

Disolver los ingredientes. Ajustar el pH de tal forma que después de esterilizar éste sea de 8,5± 0,2. Esterilizar en autoclave 10 minutos a 121°C.

**Agar Tiosulfato, Citrato, Sales Biliares y Sacarosa (TCBS)**

**FORMULA**

|  |  |
| --- | --- |
| Extracto de levadura | 5 g |
| Proteosa peptona | 10 g |
| Sacarosa | 20 g |
| Tiosulfato de sodio.5H2O | 10 g |
| Citrato de sodio.2H2O | 10 g |
| Sales biliares | 3 g |
| Bilis de buey | 5 g |
| Cloruro de sodio | 10 g |
| Citrato férrico | 1 g |
| Azul de bromotimol | 40 mg |
| Azul de timol | 40 mg |
| Agar | 15 g |
| Agua destilada | 1 000 ml |

Preparar en un matraz por lo menos tres veces más grande que el volumen requerido de medio. Adicionar los ingredientes en agua destilada tibia y calentar con agitación constante hasta ebullición e inmediatamente retirar del calor. No esterilizar. Enfriar a 50°C y colocar en cajas de Petri. Dejar secar las placas de 37-45°C antes de usar.

**Agar modificado con Celobiosa, Polimixina B y Colistina (mCPC)**

**SOLUCION 1 FORMULA**

|  |  |
| --- | --- |
| Peptona | 10 g |
| Extracto de carne | 5 g |
| Cloruro de sodio | 20 g |
| Solución Stock de colorante 1 000 | 1 ml |
| Agar | 15 g |
| Agua destilada | 900 ml |

Ajustar el pH a 7,6. Hierva hasta que se disuelva el Agar. Esterilizar por autoclave 15 minutos a 121°C. Enfríe de 48-55°C.

**SOLUCION STOCK DE COLORANTES 1 000 X :**

**FORMULA**

|  |  |
| --- | --- |
| Azul de Bromotimol | 4 g |
| Rojo de cresol | 4 g |
| Etanol al 95% | 100 ml |

Para obtener un color firme del medio usar una solución colorante stock en lugar de estar pesando repetidamente los colores en polvo. Disuelva el colorante en etanol hasta obtener una solución al 4% (peso/volumen). Agregue 1 ml de esta solución a cada litro de agar mCPC, la cual tendrá al final 40 mg de Azul de Bromotimol y 40 mg de Rojo Cresol por litro.

**SOLUCION 2: FORMULA**

|  |  |
| --- | --- |
| Celobiosa | 10 g |
| Colistina | 400 000 Ul |
| Polimixina B | 100 000 UI |
| Agua destilada | 100 ml |

Disuelva la celobiosa por calentamiento en agua destilada. Enfríe y agregue los antibióticos. Esterilice por filtración, agregue la solución 2 a la solución 1 mezcle y distribuya en cajas Petri.

**Agar T1N1 (Agar Triptona y Sal)**

**FORMULA**

|  |  |
| --- | --- |
| Triptona o tripticasa | 10 g |
| Cloruro de sodio | 10 g |
| Agar | 20 g |
| Agua destilada | 1 000 ml |

Suspenda los ingredientes y hierva hasta disolución del agar, si lo desea inclinado, distribuya en tubos. Esterilice en autoclave 15 minutos a 121°C. Deje solidificar los tubos inclinados, para placas enfríe el medio de 45-50°C y distribuya en cajas Petri estériles.

**Agar Gelatina (GA)**

**FORMULA**

|  |  |
| --- | --- |
| Peptona | 4 g |
| Extracto de levadura | 1 g |
| Gelatina | 15 g |
| Agar | 15 g |
| Agua destilada | 1 000 ml |

Suspenda los ingredientes y hierva hasta disolución de la gelatina y el agar, ajuste el pH a 7,2 ± 0.2. Esterilice en autoclave 15 minutos a 121°C. Enfríe de 45-50°C y distribuya en cajas Petri estériles.

**Agar Gelatina con Sal (GS)**

Preparar agar gelatina (GA), pero adicionando 30 g de Cloruro de Sodio por cada litro. Suspenda los ingredientes y hierva hasta disolver la gelatina y el agar. Ajuste el pH de 7,2 ± 0,2. Esterilice en autoclave 15 minutos a 121°C. Enfríe de 45-50°C, coloque en cajas Petri. Si es necesario para inhibir la diseminación de *Vibrio spp* tal como *V. alginolyticus*, use de 25-30 g de agar por litro.

**Caldo Glucosa de Hugh-Leifson**

**FORMULA**

|  |  |
| --- | --- |
| Peptona | 2 g |
| Extracto de levadura | 0,5 g |
| Cloruro de Sodio | 20 g |
| Dextrosa | 10 g |
| Púrpura de Bromocresol | 0,015 g |
| Agar | 3 g |
| Agua destilada | 1 000 ml |

Suspenda los ingredientes y hierva hasta disolver el agar. Ajuste el pH a 7,4 ± 0,2. Coloque en tubos y esterilice en autoclave 15 minutos a 121°C.

**Medio Base de Descarboxilasa (Arginina, Lisina y Ornitina)**

**FORMULA BASE**

|  |  |
| --- | --- |
| Peptona | 5 g |
| Extracto de levadura | 3 g |
| Dextrosa (D-glucosa) | 1 g |
| Púrpura de Bromocresol | 0.02 g |
| Agua destilada | 1 000 ml |

Para caldo de Arginina, Lisina y Ornitina, adicione 5 g de L-aminoácido a 1 litro de base. Como control, use base sin suplemento (aminoácido). Para Vibrio spp halofílicos, adicionar 15 g de Cloruro de Sodio por litro. Ajuste el pH de tal manera que después de la esterilización sea de 6,5 ± 0,2. Distribuya en tubos y esterilice en autoclave 10 minutos a 121°C.

**Caldo Triptona y Caldos Triptona Sal T1N0,T1N1,T1N3 y T1N6,T1N8 y T1N10**

**FORMULA**

|  |  |
| --- | --- |
| Triptona o Tripticasa | 10 g |
| Cloruro de Sodio | 0,10,30,60,80, o 100 g |
| Agua destilada | 1 000 ml |

Disuelva los ingredientes en agua destilada, para T1N0 no agregue Cloruro de sodio, para T1N1 use 10 g de Cloruro desodio (1% w/v concentración de cloruro de sodio); así respectivamente. Para T1N3 usar 30 g de NaCl por litro (3% w/v concentración de cloruro de sodio) Distribuya en tubos de tapón de rosca de 16 x 150 mm, tape los tubos. Esterilice en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Ajuste el pH a 7,2 ± 0,2.

**Caldo Soya Tripticasa (TSB)**

**FORMULA**

|  |  |
| --- | --- |
| Peptona de Tripticasa (Triptona) | 17 g |
| Peptona de fitona (Soytona) | 3 g |
| Cloruro de Sodio | 5 g |
| Fosfato dipotásico | 2,5 g |
| Dextrosa | 2,5 g |
| Agua destilada | 1 000 ml |

Suspenda los ingredientes en agua destilada y caliente hasta disolución. Distribuya 225 ml en matraces de 500 ml o tubos. Esterilice en autoclave durante 15 minutos a 121°C. El pH final debe ser de 7,2 ± 0,2.

**Agar Soya Tripticasa (TSA)**

**FORMULA**

|  |  |
| --- | --- |
| Peptona tripticasa (Triptona) | 15 g |
| Peptona de fitona (Soytona) | 5 g |
| Cloruro de Sodio | 5 g |
| Agar | 15 g |
| Agua destilada | 1 000 ml |

Suspenda los ingredientes en agua destilada y hierva durante un minuto hasta disolución del agar. Para *Vibrio spp* halofílicos, agregar 15 g de Cloruro de Sodio. Distribuya dentro de tubos o matraces. Esterilice en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Deje solidificar los tubos inclinados o deje enfríar de 45-50°C y distribuya en cajas Petri. El pH final debe ser de 7,3 ± 0,2.

**Agar de Hierro Kligler (KIA)**

**FORMULA**

|  |  |
| --- | --- |
| Peptona polipeptona | 20 g |
| Lactosa | 20 g |
| Dextrosa | 1 g |
| Cloruro de Sodio | 5 g |
| Citrato férrico amoniacal | 0,5 g |
| Tiosulfato de sodio | 0,5 g |
| Rojo de fenol | 0,025 g |
| Agar | 15,0 g |
| Agua destilada | 1 000 ml |

Suspender los ingredientes y hervir hasta disolución del agar. Distribuir en tubos de tapón de rosca. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Dejar solidificar los tubos inclinados. Ajustar el pH de 7,4 ± 0,2.

**Agar Arginina Glucosa Inclinado (AGS)**

**FORMULA**

|  |  |
| --- | --- |
| Peptona | 5 g |
| Extracto de levadura | 3 g |
| Tristona | 10 g |
| Cloruro de Sodio | 20 g |
| Glucosa | 1 g |
| L-Arginina. (hidrocloruro) | 5 g |
| Citrato férrico amónico | 0,5 g |
| Tiosulfato de Sodio | 0,3 g |
| Púrpura de Bromocresol | 0,2 g |
| Agar | 13,5 g |
| Agua destilada | 1 000 ml |

Suspender los ingredientes en agua destilada, hervir hasta disolución del agar, y distribuir en cantidades de 5 ml a tubos de 13 x 100 mm. Ajustar el pH de 6,8 a 7,0. Esterilizar en autoclave de 10 a 12 minutos a 121°C. Deje solidificar el medio inclinado.

**Agar Triple Azúcar y Hierro (TSI)**

**FORMULA**

|  |  |
| --- | --- |
| Polipeptona | 20 g |
| Cloruro de Sodio | 5 g |
| Lactosa | 10 g |
| Sacarosa | 10 g |
| Glucosa | 1 g |
| Sulfato ferroso amónico | 0,2 g |
| Tiosulfato de Sodio | 0,2 g |
| Rojo de fenol | 0,025 g |
| Agar | 13 g |
| Agua destilada | 1 000 ml |

Disolver los ingredientes en agua destilada. Mezclar bien y calentar a ebullición, agitando ocasionalmente hasta completa disolución. Enfríar a 60°C y ajuste el pH de 7,3 ± 0,1.

**Agar de Hierro y Lisina (LIA)**

**FORMULA**

|  |  |
| --- | --- |
| Peptona o gelisato | 5,0 g |
| Extracto de levadura | 3,0 g |
| Glucosa | 1,0 g |
| L-Lisina | 10,0 g |
| Citrato férrico amónico | 0,5 g |
| Tiosulfato de sodio | 0,04 g |
| Púrpura de bromocresol | 0,02 g |
| Agar | 15,0 g |
| Agua destilada | 1 000 g |

Disolver los ingredientes en el agua destilada y mezclar bien; calentar hasta ebullición con agitación frecuente hasta conseguir la disolución completa. Esterilizar en autoclave 12 minutos a 121°C. Enfríar de 50-60°C y ajustar el pH de 6,7 ± 0,1. Distribuir en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm. Los tubos se enfrían en posición inclinada, de tal modo que se obtengan columnas de medio de 3 cm y una parte inclinada de 2 cm.

**Caldo Rojo de Metilo y Vogues Proskauer(RM-VP)**

**FORMULA**

|  |  |
| --- | --- |
| Peptona | 7 g |
| Glucosa | 5 g |
| Fosfato dipotásico | 5 g |
| Agua destilada | 1 000 ml |

Disolver los ingredientes en 800 ml de agua tibia. Para *Vibrio spp* halofílicos, agregar 15 g más de Cloruro de Sodio (para una concentración final del 2%). Filtrar, enfríar a 20°C y diluir a 1 litro. Distribuya en tubos. Esterilizar en autoclaves durante 12 - 15 minutos a 121°C. Ajustar el pH de 6,9 ± 0,2.

**Medio para prueba de movilidad (Semisólida)**

**FORMULA**

|  |  |
| --- | --- |
| Peptona | 10 g |
| Extracto de carne | 3 g |
| Cloruro de Sodio | 5 g |
| Agar | 4 g |
| Agua destilada | 1 000 ml |

Calentar con agitación y hervir de 1 a 2 minutos hasta disolución del agar. Para *Vibrio spp* halofílicos agregar 15 g más de Cloruro de Sodio (para una concentración final del 2%). Distribuir en tubos con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C. Ajustar el pH de 7,4 ± 0,2.

**B.19.1.2** **Soluciones y reactivos**

**Prueba de Rojo de Metilo.**

**Reactivo. Fórmula**

|  |  |
| --- | --- |
| Rojo de metilo | 0,1 g |
| Alcohol etílico | 300 ml |
| Agua destilada | 200 ml |

Disolver el Rojo de Metilo en el alcohol y diluir con el agua destilada, para llevar a cabo la prueba, añadir 5 gotas de la solución a 5 ml del cultivo problema.

Resultados: Un color rojo demuestra un pH menor a 4,5 y la prueba es Positiva. Un color amarillo se reporta como prueba Negativa.

**Prueba de Vogues-Proskauer.**

Esta prueba es para comprobar la presencia del Diacetilo.

**Reactivo. Fórmula**

|  |  |
| --- | --- |
| Alfa Naftol | 5 g |
| Alcohol Etílico absoluto | 100 ml |

Añadir 0,6 ml de la solución de Alfa Naftol y 0,2 ml de una solución acuosa al 40% de KOH a 1 ml de cultivo.

Resultados: El desarrollo de una coloración roja en 15 minutos constituye una reacción POSITIVA.

**Prueba de Oxidasa.**

Reactivo

**FORMULA**

|  |  |
| --- | --- |
| N,N,N,N-Tetrametil-p-Fenilendiamino | 0,5 g |
| Agua destilada | 100 ml |

Conservar en frasco oscuro a 5-10°C. El reactivo se conserva durante 14 días. Sembrar en un tubo de base de gelosa para sangre. Incubar 18 horas a 35°C. Agregar 0,3 ml de reactivo.

Resultado: La reacción positiva se observa por la producción de un color azul en un minuto.

**Reacción de Indol.**

**REACTIVO DE KOVAC**

**FORMULA**

|  |  |
| --- | --- |
| p-dimetilaminobenzaldehído | 5.0 g |
| Alcohol amílico.o alcohol isoamílico | 750 ml |
| Acido clorhídrico concentrado | 25 ml |

Disolver el p-dimetilaminobenzaldehído en el alcohol amílico y agregar el ácido clorhídrico lentamente, gota a gota y agitando. Debe conservarse en frasco ámbar con tapón esmerilado; el color del reactivo va del amarillo al café claro. Se debe conservar a 4°C.

**B.19.1.3 Procedimiento:**

Sembrar un tubo con 5 ml de caldo triptona. Incubar 48 horas a 35°C. Agregar de 0,2 a 0,3 ml del reactivo. El desarrollo de un color intenso, constituye una prueba Positiva para indol.

**B.19.1.4** Toma de muestra

La toma de muestra para análisis microbiológicos, se deberá hacer en condiciones asépticas y en recipientes estériles.

**B.19.1.4.1** Preparación de la muestra

Las muestras de moluscos bivalvos deberán analizarse en su composición básica de líquido y carne. Para moluscos bivalvos desconchar de 10 a 12 piezas grandes, incluir el líquido. Verter 50 g en 450 ml de agua peptonada alcalina (APW), licúe para homogeneizar durante 2 minutos a alta velocidad. Esta es la dilución 1:10. Colocar 250 g de esta dilución en un segundo recipiente estéril. Preparar dos series de diluciones 1:100 y 1:1000. En este momento deberá tener dos series de tres diluciones. Incubar una serie a 35-37°C y la otra a 42°C.

**B.19.1.4.1.1** Resembrar

Después de la incubación, y sin agitar, transferir el inóculo de la película (crecimiento superficial) con un asa de 3-5 mm de diámetro a una placa por lo menos, de cada uno de los medios de cultivo selectivos: Agar con tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa (TCBS) o al agar modificado con celobiosa, polimixina B y colistina (mCPC), la polimixina inhibe al biotipo Clásico de *V. cholerae*. Incubar el agar TCBS durante 18 a 24 horas de 35-37°C y el agar mCPC durante 18 a 24 horas de 39-40°C.

**B.19.1.4.2** Morfología colonial.

Examinar las placas a fin de determinar si se presentan las características coloniales que a continuación se describen, seleccionar por lo menos 3 colonias sospechosas de cada placa y aplicarlas con estria cruzada para aislar en agar T1N1 o en agar soya tripticasa con sal (al 2% de concentración de NaCl) e incubar durante 12-18 horas a 35-37°C. Es necesario hacer un cultivo en un medio no selectivo a fin de garantizar la pureza de las colonias, antes de las pruebas bioquímicas, se puede inocular a los agares gelatina (GA) y gelatina sal (GS) en el segundo día. Los resultados serán confiables si las placas de aislamiento muestran colonias puras.

a.- **Agar TCBS.** Las colonias de *V. cholerae* (El Tor y Clásico) son grandes, lisas, amarillas (positivas para la fermentación de la sacarosa) y ligeramente achatadas, con el centro opaco y los bordes translúcidos.

**Nota:** Las especies de *Vibrio* no producen colonias pequeñas de color crema en agar TCBS. Las colonias de *V. mimicus*, que están estrechamente relacionadas con la especie anterior, son verdes (sacarosa negativas). La mayoría de las demás especies de *Vibrio* crecen en agar TCBS y producen colonias amarillas y verdes.

b.- **Agar mCPC.** Las colonias de *V. cholerae* El Tor son púrpuras (negativas para la fermentación de la celobiosa). El *V. vulnificus* produce colonias amarillas achatadas, con el centro opaco y los bordes translúcidos. La mayoría de las demás especies de *Vibrio* no crecen fácilmente en agar mCPC.

**B.19.1.4.3** **Diferenciación.**

Diferenciación de los vibrios sospechosos de los microorganismos que no son vibrios.

a.- TSI, KIA y agar inclinado de Arginina y Glucosa (AGS). Inocular las colonias individuales en medios de cultivo TSI (Agar de Triple Azúcar y Hierro), KIA (Agar de Hierro Kliger) y AGS, picar y estriar en el agar inclinado. Incubar los tubos inoculados, con el tapón no muy apretado, durante 18 a 24 horas de 35-37°C. Se recomiendan estos medios porque las reacciones permiten efectuar una diferenciación presuntiva entre la mayoría de las especies de *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas,* *Shigella* y otras bacterias.

b.- Caldo triptona al 3% de NaCl (T1N3). Inocular las colonias en los caldos T1N0 y T1N3 e incubar durante 18 a 24 horas de 35-37°C. El *V. cholerae* y el *V. mimicus* crecerán en T1N0 y T1N3. Algunas especies de bacterias que no son vibrios y que presentan reacciones similares a las de *V. cholerae* en medios de TSI y LIA no crecen en T1N3. La mayoría de las especies *Vibrio* spp, incluyen algunos *V. cholerae* No. 01, crecerán en T1N3 unicamente de la familia Vibrionaceae crece solamente en T1N3.

Una alternativa consiste en usar agar gelatina (GA) y agar gelatina con 3% de NaCl (GS) para determinar la tolerancia de los cultivos puros a la sal. Dividir las placas en ocho sectores, inocular una línea recta en el centro de un sector de las placas, tanto de GA como de GS con cada cultivo puro. Incubar durante 18 a 24 horas de 35-37°C. El *V. cholerae* y el *V. mimicus* crecerán. El *Vibrio spp* halofílico crecerá en ambas placas, porque ellos no requieren de sal. Sólo en la placa con GS. Para leer la reacción de la gelatinasa sostener la placa sobre una superficie negra, observará un halo opaco alrededor de la colonia de los microorganismos gelatinasa positivos.

c.- Caldo glucosa de Hugh-Leifson.

Inocular colonias individuales en tubos duplicados con caldo de glucosa de Hugh-Leifson. Recubrir un tubo con una capa de aceite mineral estéril o vapor líquido (50% de petrolato y 50% de parafina) unos dos centímetros de grueso. Incubar ambos tubos durante 18 a 24 horas de 35-37°C. Las especies de *Vibrio spp* utilizan la glucosa tanto para la oxidación como para la fermentación. Las especies de Pseudomonas, que comúnmente se aíslan del pescado y los mariscos con métodos de enriquecimiento que se usan para las especies de *Vibrio*, utilizan la glucosa sólo para la oxidación.

d.- Prueba de oxidasa.

Realizar la prueba de oxidasa con cultivos puros de agar soya tripticasa (2% de NaCl) u otro medio que no contenga carbohidratos fermentables. Un método fácil consiste en colocar un círculo de papel filtro en una caja de Petri y humedecerlo con algunas gotas de reactivo de oxidasa. Con un palito aplicador de madera, un mondadientes o una asa de platino estéril, sacar un poco de cultivo de la placa y tocar el papel humedecido, si hay microorganismos oxidasa positivos, el papel se tornará púrpura oscura o azul en pocos segundos. Las especies patógenas de *Vibrio* son oxidasa positivas (excepto el *V. metschnnikovii*).

**B.19.2** **Identificación y Confirmación de *V. cholerae* 01, *V.cholerae* NO 01 y *V. mimicus*.**

a.- Leer los resultados de las prueba bioquímicas de TSI, KIA, AGS, T1N0 y T1N3 o GA y GS, y caldo glucosa de Hugh-Leifson.

b.- Hacer una tinción de Gram a un cultivo de 18 a 24 horas en caldo o agar.

**Nota:** Los cultivos puros que se someterán a las demás pruebas serológicas y bioquímicas para el ***V.*** *cholerae* son sacarosa positivos (amarillo) en agar TCBS y sacarosa negativos (verdes) en el caso de *V. mimicus* o son celobiosa negativos (verde-púrpura) en agar mCPC, crecen en caldo T1N0 o en placas con GA; presentan reacciones características en TSI, KIA y AGS. Son gelatina y oxidasa positivos, son bacilos curvos gram negativos y producen ácido a partir de la glucosa, tanto en la oxidación como en la fermentación, en el caldo de cultivo de Hugh-Leifson.

c.- Pruebas bioquímicas.

Las reacciones bioquímicas para identificación de *V. cholerae* y otras especies bacterianas afines figuran en el cuadro anexo. La fórmula para todos los medios bioquímicos deberá contener por lo menos un 2% de NaCl. En vez de medios convencionales se pueden usar tiras AP120E, con 2% de NaC1 como diluyente. Para el *V. cholerae* se puede usar solución salina fisiológica (0,85% de NaC1) como diluyente.

d.- Prueba serológica de aglutinación.

Usar antisuero de diagnóstico del grupo 01 y del subgrupo Inaba (factores AC) y Ogawa (Factores AB) para el antígeno del serotipo 01. Usar cultivos de 16 a 24 horas producidos en TSA. Incluir cultivos positivos y negativos, y los controles salinos para cada antisuero usado. Seguir las instrucciones del antisuero. Como es posible que los antígenos de los antisueros estén relacionados entre sí, hay que realizar pruebas bioquímicas para confirmar que el cultivo puro sea de *V. cholerae* 01 o No. 01.

Nota: Anticuerpos monoclonales están disponibles, pero el anti-B y anti-C reaccionan opuestamente con bacterias de otras especies. Uso de anticuerpos policlonales y/o monoclonales será para el antígeno del complejo 01

1.- Los cultivos que aglutinan con el antisuero del grupo 01, pero no en solución salina fisiológica simple, son de *V. cholerae* del grupo 01 si las reacciones bioquímicas confirman que el cultivo puro es de *V. cholerae*. Los cultivos que se aglutinan con este antisuero para grupos específicos pueden ser clasificados según el subtipo con anticuerpos Inaba y Ogawa.

Los cultivos que aglutinan con el suero polivalente (grupo 01) y con los antisueros Inaba y Ogawa, tienen los 3 factores (A, B y C) y son del serotipo Hikojima.

Los cultivos que aglutinan con el antisuero polivalente pero no aglutinan con antisueros Inaba y Ogawa, no se pueden tipificar con estos antisueros.

2.- Los cultivos de *V. cholerae* cuya identidad se haya confirmado con métodos bioquímicos y que no aglutinen con el antisuero del grupo 01 son *V. cholerae* 0:1. El suero para la clasificación de *V. cholerae* No 0:1 según el tipo se puede obtener de R.J. Siebeling.

3.- Los cultivos que se aglutinan en el antisuero del grupo 01 y en solución salina, no se pueden clasificar según el tipo. Sin embargo, si se usa un medio más rico, como en TSA o agar infusión cerebro corazón (BHI), se puede eliminar esta autoaglutinación.

e. Características mínimas para la identificación de *V. cholerae*.

Las características que permiten suponer la presencia de *V. cholerae* como mínimo son las siguientes:

1.- Morfología.

Bacilo o bacilo encorvado, esporogénico y gram negativo.

2.- Aspecto en TSI.

Estria ácido, picadura ácido, gas negativo y H2S negativo.

3.- Prueba de Hugh-Leifson.

Fermentación de la glucosa y oxidación positiva.

4.- Citocromo-oxidasa positivo.

5.- Prueba de la Dihidrolasa arginina: negativo.

6.- Prueba de la Lisinadescarboxilasa: positivo.

7.- Prueba de VP: Positivo El Tor, negativo Clásico y *V. mimicus*.

8.- Crecimiento a 42°C: positivo.

9.- Prueba de halofilia con NaCl. 0% : positivo, 3% : positivo, 6%: usualmente negativo. Algunas cepas de *V. cholerae* NO 01 se desarrollan a 0% de NaCl.

10.- Fermentación de la sacarosa: positivo para *V. cholerae* (negativo para *V. mimicus*).

11.- Prueba de ONPG: positivo.

12.- Fermentación de la arabinosa: negativo.

13.- 0/129 sensitiva: sensible para 10 y 150 µg 0/129

REACCIONES DE ALGUNOS Vibrio EN AGAR KIA, TSI Y AGS.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Microorganismos** | **KIA**  **EstrIa Picadura** | | **TSI**  **EstrIa Picadura** | | **AGS**  **EstrIa Picadura** | |
| V. cholerae | K | A | A(K)\* | A | K | a |
| V. mimicus | K | A | K(A)\* | A | K | A |
| V .parahemolyticus | K | A | K | A | K | A |
| V. alginolyticus | K | A | A | A | K | A |
| V. vulnificus | K o A | A | K(A)\* | A | K | A |
| V. hidrophyla | K o A | A | K o A | A | K | K |
| V. shigelloides | K o A | A | K o A | A | N | N |

\* = Raramente

K = Alcalino

A = Acido

a = Ligeramente ácido

N = Neutro

Ninguna de las especies de *Vibrio* enumeradas produce sulfuro de hidrógeno en medios KIA, TSI o AGS, ni una cantidad perceptible de gas a partir de glucosa en medios KIA, TSI o AGS. Algunas especies de *Aeromonas* pueden producir gas a partir de glucosa en estos medios.

**B.20. DETERMINACION DE *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* Y SUS TOXINAS EN ALIMENTOS Y MUESTRAS CLINICAS**

**B.20.1** **Fundamento**

Demostrar la presencia de toxina botulínica por inyección a ratones con extractos de alimentos o muestras clínicas y observar el efecto letal. Comprobar con el antisuero específico la neutralización de la toxina. La determinación de *C* *botulinum* se basa en el cultivo de muestras de alimentos y clínicas en condiciones de anaerobiosis en medios específicos y la subsecuente demostración de la toxina.

**B.20.2 Toma y manejo de muestras**

**B.20.2.1** Alimentos

Las muestras pueden tomarse de sobrantes de los alimentos sospechosos o de recipientes cerrados. Cuando están involucrados alimentos comerciales, es importante observar la etiqueta, número de lote del fabricante, o cualquier dato relevante que pueda identificar el origen de la muestra.

**B.20.2.2** Clínicas

Las muestras clínicas para el análisis incluyen: materia fecal, aproximadamente 10 g, contenido gástrico (ajustar aproximadamente a pH 6 con hidróxido de sodio 0,1) y suero (colectado de 20 ml de sangre ANTES DE ADMINISTRAR LA ANTITOXINA). Cuando se sospecha de botulismo infantil es importante analizar las heces. Si fuera necesario, las manchas o partes sólidas de los pañales.

**B.20.3** Envío de muestras

**B.20.3.1** Para un envío seguro, el interior de los empaques deben contener:

**(I)** Un primer recipiente impermeable al agua.

**(II)** Un segundo recipiente impermeable al agua.

**(III)** Material absorbente (por ejemplo unicel) entre los dos contenedores, suficiente para absorber el contenido entero del primer recipiente.

**B.20.3.2** De preferencia enviar el material en refrigeración en paquetes que contengan recipientes con gel congelado. Para una máxima preservación de la toxina el recipiente secundario debe empacarse en una caja de unicel con recipientes de gel congelado. Sin embargo, si se sospecha retraso en el envío, el material debe congelarse y empacarse con hielo seco.

**B.20.4 Material y equipo**

0,1 N NaOH o NaHCO3 saturado para limpiar posibles derrames.

Flujo laminar

Propipeta o bulbo

Lentes de seguridad

Guantes de cirujano

Tubos de centrífuga de 40 ml de capacidad

Centrífuga refrigerada con capacidad de 15 000 x g

Jeringas desechables de 19 x 15.

Filtros desechables de 0,45 m.

Vortex

Licuadora

Solución de tetraciclina al 0,2%

Potenciómetro

Incubadora 30º, 35ºC

Balanza

Equipo para tinción de Gram

Tubos de ensayo de 13 x 100 mm

Antisuero monovalente A, B, E y F

Antisuero trivalente ABE

Jeringas para tuberculina

Ratones de preferencia hembras de 20 a 30 g cepa CFI o NIH

Solución reguladora de fosfatos con gelatina

Tripsina al 1% p/v

Tripsina al 1,4%

Medio carne cocida (CMM)

Caldo tripticasa peptona glucosa extracto de levadura (TPGY).

Caldo tripticasa peptona glucosa extracto de levadura (TPGYT) con tripsina

Agar aislamiento *Clostridium* *botulinum* (CBI)

Agar hígado de ternera yema de huevo

Agar esporulación de Eklund

Baño de agua (75-100ºC)

Etanol al 50% o absoluto

Jarras y sistema de anaerobiosis

**B.20.5 Preparación de medios de cultivo**

**B.20.5.1 Medio de la carne cocida (CMM).**

|  |  |
| --- | --- |
| **FORMULA** | |
| Corazón de res | 454 g |
| Proteosa peptona | 20 g |
| Bactodextrosa | 2 g |
| Cloruro de sodio | 5 g |
| Extracto de corazón de res | 1000 ml |

Picar el corazón de res, sumergir en agua y calentar hasta ebullición durante 1 h. Enfriar, ajustar el pH a 7,0, y hervir 10 minutos. Filtrar a través de muselina y presionar para drenar el exceso de líquido de la carne. Guardar la carne cocida. Agregar los ingredientes al filtrado y ajustar a pH 7,0, agregar agua hasta hacer 1000 ml. Filtrar a través de papel filtro poroso. Se puede conservar el caldo y la carne en congelación por separado. Agregar el corazón cocido y picado a tubos de ensaye de 18 x 150 mm o 20 x 150 mm a una altura de 1,2 a 2,5 cm del tubo y adicionar de 10 a 12 ml del caldo. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121ºC. Si este medio se almacena por más de 12 h después de su preparación, debe calentarse a ebullición por 10 minutos y enfriar antes de su uso.

**B.20.5.2 Caldo tripticasa peptona glucosa extracto de levadura (TPGY).**

|  |  |
| --- | --- |
| **FORMULA** | |
| Tripticasa | 50 g |
| Peptona | 5 g |
| Glucosa | 4 g |
| Extracto de levadura | 20 g |
| Tioglicolato de sodio | 1 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

Disolver los ingredientes en agua caliente, enfriar y ajustar a pH 7,2. Distribuir en volúmenes de 2 ml en tubos de 20 x 150 mm con tapón de rosca. Esterilizar por vapor fluente, enfriar a la temperatura y almacenar a 4ºC hasta 6 semanas. Si se almacena más de 12 h tratarlos con calor como se indica en 4.5.1. Agregar 1,5 ml de solución de tripsina al 1,4% por cada tubo con 21 ml del medio TPGY. Mezclar muy suavemente. Este medio no se puede almacenar.

**B.20.5.3** Caldo tripticasa peptona glucosa extracto de levadura adicionado con tripsina (TPGYT).

|  |  |
| --- | --- |
| **FORMULA** | |
| Tripticasa | 50 g |
| Peptona | 5 g |
| Glucosa | 4 g |
| Extracto de levadura | 20 g |
| Tioglicolato de sodio | 1 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

Disolver los ingredientes en agua caliente, enfriar y ajustar a pH 7,2. Distribuir en volúmenes de 2 ml en tubos de 20 x 150 mm con tapón de rosca. Esterilizar por vapor fluente, enfriar a la temperatura y almacenar a 4ºC hasta 6 semanas. Si se almacena más de 12 h tratarlos con calor como se indica en B.5.5.1. Agregar 1,5 ml de solución de tripsina al 1,4% por cada tubo con 21 ml del medio TPGY. Mezclar muy suavemente. Este medio no se puede almacenar.

**B.20.5.4** Agar hígado de ternera yema de huevo.

**a)** Agar hígado de ternera.

|  |  |
| --- | --- |
| **FORMULA** | |
| Infusión de hígado | 50 g |
| Infusión de ternera | 500 g |
| Proteosa peptona | 20 g |
| Neopeptona | 1,3 g |
| Triptona | 1,3 g |
| Dextrosa | 5,0 g |
| Almidón soluble | 10,0 g |
| Caseína isoeléctrica | 2,0 g |
| Cloruro de sodio | 5,0 g |
| Nitrato de sodio | 2,0 g |
| Gelatina | 20,0 g |
| Agar | 15,0 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

Calentar con agitación constante hasta dilución completa. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121ºC, pH final 7,3 + 0,2. Agregar por cada 500 ml del medio base fundido 40 ml de la suspensión salina de yema de huevo. Mezclar y vaciar a cajas de Petri estériles de 15 x 100 mm (aproximadamente 15 - 20 ml). Secar las placas a temperatura del laboratorio por 2 días o a 35ºC por 24 horas. Verificar esterilidad de las placas. Almacenar en refrigeración.

**b)** Emulsión al 50% de yema de huevo.

Lavar los huevos con un cepillo suave y dejar escurrir. Sumergirlos por 1 hora en solución de cloruro mercúrico al 0,1%, escurrir. Sumergir en una solución de etanol al 70% y dejar durante 30 minutos, escurrir. Abrir los huevos en condiciones asépticas y descartar las claras. Colocar las yemas en un recipiente estéril y mezclar con igual volumen de solución salina fisiológica (0,85%) estéril. Guardar en refrigeración hasta su uso.

**B.20.5.5** Agar para asilamiento de *C*. *botulinum* (CBI).

El agar CBI es una modificación del medio agar McClung Toabe para el aislamiento selectivo y diferencial de *C*. *botulinum*, el cual puede aislarse de los cultivos toxigénicos de CMM, provenientes de muestras de heces, líquido gástrico o alimentos. El medio de agar CBI contiene: Cicloserina 250 g/ml, sulfametoxazol 76 g/ml y trimetroprim 4 g/ml en la base del medio agar McClung Toabe yema de huevo.

Agar McClung Toabe

|  |  |
| --- | --- |
| **FORMULA** | |
| Proteosa peptona | 40 g |
| Bacto dextrosa | 2 g |
| Fosfato de sodio dibásico | 1 g |
| Fosfato de potasio monobásico | 1 g |
| Cloruro de sodio | 2 g |
| Sufato de magnesio | 0,1 g |
| Agar | 25 g |
| Agua destilada | 1000 ml |
| pH final | 7,6 0,2 a 25ºC |
| Extracto de levadura | 5 g |
| Suspensión de yema de huevo | 100 ml |

**SOLUCION DE ANTIBIOTICOS**

Cicloserina 250 mg o 25 ml de una solución al 0,1%

Sufametoxasol 76 mg o 4 ml de una solución al 1,9%. Disolver el sulfametoxazol en solución 2 N de NaOH.

Lactato deTrimetroprim 4 mg o 4 ml de una solución al 0,1% por cada 100 ml de medio base. Esterilizar por filtración.

**Preparación:** Agregar el extracto de levadura y los ingredientes del agar McClug Toabe a un matraz de 2 L con 900 ml de agua destilada, mezclar y calentar hasta disolución. Ajustar a pH 7,5. Esterilizar 15 minutos a 121ºC en autoclave. Enfriar a 55ºC en baño de agua y en condiciones asépticas agregar 100 ml de la suspensión al 50% de yema de huevo. Agregar los volúmenes necesarios para conservar la concentración de antibióticos por litro de medio base. Mezclar y distribuir en cajas de Petri estériles de 15 x 100 mm aproximadamente 15-20 ml por placa. Dejar solidificar y colocar en bolsas de plástico. Guardar en refrigeración hasta su uso. Estas placas pueden almacenarse hasta 1 mes aproximadamente.

**B.20.5.6** **Agar para esporulación de Eklund.**

|  |  |
| --- | --- |
| **FORMULA** | |
| Tripticasa | 4 g |
| Peptona | 1 g |
| Glucosa | 0,1 g |
| Extracto de levadura | 1 g |
| Agar | 4 g |
| Agua destilada | 200 ml |

Disolver los ingredientes en agua caliente, excepto el agar, ajustar a pH 7,8, agregar el agar. Esterilizar por vapor y enfriar a 50ºC. Agregar 2 ml de solución al 10% de clorhidrato de cisteína, esterilizada por filtración; 12 ml de emulsión de yema de huevo y 2 ml de sangre citratada de bovino o borrego. Preparar las placas. Este medio es particularmente adecuado para la esporulación de *C*. *botulinum* del grupo II.

**B.20.6** Diluyentes y reactivos

**B.20.6.1** **Solución amortiguadora de fosfatos con gelatina**

|  |  |
| --- | --- |
| **FORMULA** | |
| Gelatina | 2 g |
| Na2HPO4 | 4 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

Ajustar a pH 6,2 con solución de ácido clorhídrico 4N. Distribuir en frascos con tapón de rosca, esterilizar por vapor, enfriar a la temperatura ambiente y almacenar a 4ºC.

**B.20.6.2** Solución de tetraciclina al 0,2%.

Disolver 50 mg en 25 ml del diluyente fosfato de gelatina, mantener a 4ºC hasta 4 días. Si se requiere almacenar por más tiempo, congelar en pequeñas porciones. Evitar la recongelación.

**B.20.6.3** Solución de tripsina (1:250).

**a)** Solución al 1%

Disolver 200 mg en 20 ml de agua destilada. No almacenar.

**b)** Solución al 1,4%.

Disolver 280 mg en 20 ml del diluyente fosfato de gelatina, filtrar a través de membrana de 0,45 m. Usar vacío para obtener efecto parcial de deareación del filtrado.

**B.20.6.4** Antisueros

A, B, E; A, B; A, B, E, C\*, D\*, F.

Investigación de sospecha de botulismo en animales.

**B.20.7** Procedimiento

**B.20.7.1** Examen microscópico de los alimentos sospechosos

Este examen no es esencial para la detección de *C*. *botulinum*, pero facilita la selección de los alimentos sospechosos para el análisis. Preparar frotis directos y hacer tinción de Gram. Si el alimento contiene exceso de grasa, sumergir los portaobjetos fijados al calor por 1-2 minutos en xilol antes de teñir.

**B.20.7.2** Preparación del material para el análisis de las toxinas.

**B.20.7.2.1** Alimentos líquidos

Centrifugar aproximadamente 20 ml a 15000 x g durante 20 minutos. Decantar cuidadosamente el sobrenadante o extraer con una jeringa desechable de 19 x 25 mm. Cubrir el tubo y conservar a 4ºC para hacer el cultivo del sedimento posteriormente. Repetir la centrifugación, si el sobrenadante aún no está claro. Esterilizar el sobrenadante por filtración a través de la membrana de 0,45 m adaptada a una jeringa desechable. Ocasionalmente puede requerirse una prefiltración durante el proceso de filtración. El propósito de la esterilización es prevenir una infección y a su vez una muerte inespecífica de los ratones inoculados.

**B.20.7.2.2** Alimentos semilíquidos

Colocar 10-15 g en tubos de centrífuga de 40 ml, agregar igual volumen de solución reguladora de fosfatos con gelatina y homogenizar en vortex.

Centrifugar y proceder como en B.20.7.2.1.

**B.20.7.2.3** Alimentos sólidos

Colocar 10-20 g en un vaso de licuadora o mortero. Agregar suficiente solución reguladora de fosfatos con gelatina para obtener cuando menos 10 ml de sobrenadante después de la centrifugación. La dilución del alimento deberá estar entre 1:1 a 1:3. Licuar a velocidad alta por 1-2 minutos. Los vasos de licuadora deberán cerrarse herméticamente para prevenir la formación de aerosoles. Centrifugar y proceder como en B.20.7.2.1, B.20.7.2.2 y B.20.7.2.3.

**B.20.7.2.4** Alimentos enlatados

Lavar y secar la superficie de la lata. Cubrir la tapa con etanol al 96%, dejar por 2 minutos; decantar y flamear el alcohol residual. Colocar la lata en una bolsa de plástico para prevenir la dispersión de aerosoles y abrir con un abrelatas estéril. Proceder como en B.20.7.2.1, B.20.7.2.2 y B.20.7.2.3.

**B.20.7.2.5** Suero

Idealmente debe obtenerse 10 ml de suero. El suero usado sirve sólo antes del tratamiento con el antisuero. Si está turbio, centrifugar a 15,000 x g durante 20 minutos, decantar el sobrenadante.

**B.20.7.2.6** Heces

Colocar 10 g en un tubo de centrífuga de 40 ml de capacidad, agregar suficiente cantidad de solución reguladora de fosfatos con gelatina para obtener al menos 10 ml de sobrenadante después de la centrifugación. Mezclar en vortex durante 2-3 minutos. Conservar la mezcla a 4ºC por 2 h. Homogeneizar en vortex. Centrifugar y proceder como en 19.7.2.1. Las muestras líquidas, enemas y el contenido intestinal se pueden centrifugar directamente con poco o sin la adición de la solución reguladora de fosfatos con gelatina. Ocasionalmente, los sobrenadantes de muestras clínicas no se pueden filtrar, en estos casos, agregar 1 ml de una solución al 0,2% de tetraciclina por cada 9 ml del sobrenadante.

**B.20.7.2.7** Contenido gástrico

Medir el pH y ajustar, si es necesario, a 5,5-6,5 con una solución 1N de NaOH. Evitar que el valor de pH sea mayor a 7,0. Centrifugar y proceder como en B.19.7.2.1.

**B.20.7.2.8** Otras muestras clínicas.

Tratar las muestras semilíquidas y sólidas como en B.20.7.2.2 y B.20.7.2.3

**B.20.8** **Análisis de las toxinas**

**B.20.8.1** Procedimiento general (se aplica cuando no se sospecha de alguna toxina en particular).

**B.20.8.1.1** Si se dispone de suficiente material, distribuir el filtrado en volúmenes de 1,2 ml dentro de 6 tubos de ensaye de 13 x 100 mm, marcados del 1-6. A los tubos marcados 2-5, agregar 0,12 ml de los siguientes antisueros: monovalente A, B o E y trivalente ABE. Mezclar en vortex y dejar reposar a temperatura ambiente por 45 minutos.

**B.20.8.1.2** Al tubo 6, agregar 0,12 ml de una solución de tripsina al 1%. Incubar a 35ºC por 60 minutos. El tubo 1 no se adiciona. Ver tabla No. 2.

**B.20.8.1.3** Si el volumen de material es insuficiente para completar la prueba, se puede omitir el tubo No. 6.

**B.20.8.1.4** Inyectar dos ratones (20-30 g) intraperitonealmente por tubo, con los volúmenes siguientes: 0,5 ml del tubo 1,0 y 0,55 ml de los tubos 2-6. Observar a los ratones por 72 h. Los síntomas típicos de botulismo son: pelo erizado, estrechamiento de cintura, dificultad para respirar, parálisis de los miembros posteriores y parálisis general antes de la muerte. Si estos síntomas se presentan después de 72 h, observar a los animales por otras 24 h hasta completar un total de 4 días.

**B.20.8.1.5** Si mueren 1 o 2 ratones repetir la inyección. Una muestra se considera positiva para la toxina si 2/2 o ? o = 2/4 ratones mueren, si se presenta la muerte de los animales dentro de las 2 primeras horas se pueden considerar que son debidas a otras causas diferentes a toxina botulínica.

**B.20.8.1.6** Si solamente mueren los ratones inoculados con las muestras tratadas con tripsina, indica la presencia de toxina de grupo II y continuar como se indica en el punto B.19.8.3.

**B.20.8.1.7** Si no se neutralizara la toxina con los antisueros A, B y E, indica

**a)** la presencia de toxinas no relacionadas en especial cuando se presentan síntomas atípicos;

**b)** Cantidad insuficiente de antisuero en presencia de altos niveles de toxina (difícil en caso de muestras clínicas y en la mayoría de los alimentos tóxicos; o

**c)** incluido un serotipo no común. Si la muestra probada produce síntomas típicos de botulismo y sin embargo no es neutralizada con los antisueros, proceder de la forma siguiente:

**I)** En casos de muy alta toxicidad, diluir la muestra 1:10 con solución amortiguadora de fosfatos gelatina y repetir la prueba de neutralización.

**II)** Incluir el antisuero F en la prueba de neutralización.

**B.20.8.2** Muestras sospechosas de contener toxina grupo V (A o B).

Proceder como se indica en 4.8.1 omitiendo el tubo No. 6.

**B.20.8.3** Muestras sospechosas de contener toxina grupo II (B o E).

Distribuir en cada uno de los tubos marcados del 1 al 4, 1,2 ml del filtrado. A cada tubo agregar 0,12 ml de una solución de tripsina al 1%, incubar a 35ºC por 60 minutos. A los tubos marcados del 2 al 4 agregar 0,12 ml de uno de los siguientes antisueros monovalente B o E y trivalente A, B y E. Mezclar y continuar como se indica en 4.8.1 Inyectar 0,5 ml del tubo No. 1 y 0,6 ml de los tubos 2 al 4.

Si no hubiese material disponible suficiente, omitir los tubos con los antisueros monovalentes B y E.

**B.20.8.4** Determinación de la dosis letal en ratón (DLR)

Si se quiere titular la toxina, hacer diluciones decimales de los sobrenadantes tratados, y no tratados con tripsina, generalmente se hacen hasta 1:1000 dependiendo del nivel de toxina esperado, pero nunca excediendo 1:10000. Inyectar 2 ratones por dilución. La recíproca de la dilución más alta que causa la muerte multiplicada por 2, es la DLR. Ejemplo: si la muerte ocurre a una dilución de 1:100 pero no de 1:1000, el nivel de toxina es de 200 a 2000 DLR por ml.

**B.20.9** Identificación de *Clostridium* *botulinum*.

**B.20.9.1** Quitar el exceso de aire disuelto en los tubos preparados con medio caldo carne cocida (CMM) y caldo glucosa peptona tripticasa extracto de levadura (TPGY), mediante calentamiento en baño de agua a ebullición por 10 minutos y enfriar antes de usarlos. Asegurarse de que las tapas de los tubos estén flojas al hacer este proceso.

**B.20.9.2** Agregar a los tubos de TPGY 1,5 ml de una solución de tripsina al 1,4% y mezclar suavemente y marcar con una T (TPGYT). A los tubos de CMM marcarlos con 1 y 2; y 3 y 4 a los tubos con TPGYT. Ver tabla No. 3.

**B.20.9.3** Cualquier tipo de muestra incluyendo los sedimentos, pueden servir como inóculo; éstos además tienen la ventaja de que no contienen inhibidores potenciales, los cuales se han eliminado junto con el sobrenadante, de aquí que los sedimentos pueden contener grandes cantidades de microorganismos por unidad de volumen.

**B.20.9.4** Colocar aproximadamente 1 g de inóculo a cada uno de los tubos 1 a 3, calentar el tubo No. 2 en baño de agua a 75ºC por 20 minutos para seleccionar esporas resistentes al calor.

**B.20.9.5** Para seleccionar esporas sensibles o resistentes al calor, suspender aproximadamente 1 g del inóculo en un volumen de 10 a 20 ml de solución de etanol al 50%, o mezclar el inóculo, cuando la muestra es líquida 1:1 con etanol absoluto o de 96%. Mantener las suspensiones o mezclas a temperatura ambiente por 60 minutos, centrifugar a 14000 x g durante 15 minutos, y pasar el sedimento al tubo No. 4.

**B.20.9.6** Incubar los tubos a 35ºC por 24 horas y a 30ºC por 4 días. Centrifugar aproximadamente 10 ml de cultivo a 15000 x g durante 20 minutos. Esterilizar el sobrenadante por filtración a través de membranas de 0,45 m, con ayuda de una jeringa desechable. Diluir el filtrado 1:5 con solución amortiguadora de fosfatos con gelatina. Continuar como se indica en B.17.6.1 para el ensayo de toxina pero omitiendo el tubo No. 6.

**B.20.9.7** Si fuera necesario neutralizar con antisuero tipo F, el cual es relativamente débil, determinar la toxicidad y diluir con solución amortiguadora de fosfatos de gelatina el sobrenadante a aproximadamente 10 DLR/ml. Mezclar volúmenes de 1,25 ml con 0,25 ml de antisuero F. Inyectar 0,5 ml sin antisuero y 0,6 ml con antisuero.

**B.20.10** Aislamiento de *Clostridium* *botulinum* a partir de cultivos toxigénicos.

**B.20.10.1** El aislamiento de cepas productoras de botulismo, se facilita si se dan todas las condiciones para la producción de toxina. Si los cultivos de los tubos Nos. 2 o 4 son toxigénicos, uno de éstos debe seleccionarse. Sembrar directamente en agar hígado de ternera yema de huevo o en agar para el aislamiento de *Clostridium* *botulinum* (CBI), en estos medios no se ha observado un enmascaramiento por microflora atípica. En el caso de que predominara flora atípica combinada con la presencia de algunas esporas de *C*. *botulinum*, el inóculo debe hacerse previo tratamiento con etanol. En el caso de ausencia de esporas, reincubar los tubos de enriquecimiento o pasar al medio de esporulación (Eklund).

**B.20.10.2** Aislamiento de *C*. *botulinum* de cultivos con presencia moderada de microorganismos atípicos.

**B.20.10.2.1** Hacer una tinción de Gram de los cultivos tóxicos. Si los cultivos 2 y 4 son tóxicos, pueden excluirse los tubos 1 y 3. Seleccionar los cultivos sobre las siguientes bases:

**i)** Bacilos gram positivos atípicos.

**ii)** Número de bacilos gram positivos con esporas. Si en la tinción se observa un mínimo de 10% de bacilos gram positivos, inocular una asada en agar hígado de ternera-yema de huevo y en agar CBI. Incubar en anaerobiosis a 30ºC por 48 horas.

**Nota:** Es importante tomar en cuenta que cultivos viejos de *C*. *botulinum* pueden aparecer como Gram negativos.

**B.20.10.2.2** Seleccionar 5 colonias bien aisladas sobre el agar hígado de ternera yema de huevo que presenten un halo opaco indicativo de lipolisis y pasarlas a caldo TPGY. Seleccionar otras 5 colonias del medio agar para el aislamiento de *C.* *botulinum* rodeadas de un halo opaco con brillo aperlado y pasar a caldo TPGY. Incubar a 30ºC durante 5 días. Hacer pruebas para determinar las toxinas como se indica en 4.6, inocular por duplicado los cultivos toxigénicos en agar hígado de ternera yema de huevo, incubar una placa en anaerobiosis y otra en aerobiosis para asegurar pureza. Nota: Es necesario inocular un gran número de colonias, debido a que *C.* *botulinum* puede enmascararse por otros clostridia que presentan características coloniales similares.

**B.20.10.3** Aislamiento de *C*. *botulinum* de cultivos con grandes cantidades de microorganismos atípicos.

**B.20.10.3.1** Si en la tinción de Gram se observan bacilos gram positivos con esporas, mezclar 2 ml del cultivo, con 2 ml de etanol al 96%, y dejar a temperatura ambiente por 60 minutos. Inocular una asada en agar hígado de ternera yema de huevo y en agar aislamiento de *C*. *botulinum*, y continuar como se indica en B.6.10.1.

**B.20.10.3.2** Si no se presenta esporulación en el medio de enriquecimiento, reincubar por otra semana a 30ºC o extender 0,1 ml del cultivo en agar de esporulación de Eklund, e incubar las placas en anaerobiosis a 30ºC hasta que las esporas estén presentes en cantidades significativas (generalmente se requieren de 5 a 10 días). Suspender una asada del cultivo en aproximadamente 2 ml de etanol al 50%, dejar a temperatura ambiente por 60 minutos, e inocular en agar hígado de ternera yema de huevo y en agar CBI. Continuar como se indica en B.20.10.1.

**TABLA No. 1 ALGUNAS CARACTERISTICAS DE *C*. *BOTULINUM* GRUPOS I Y II**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **GRUPO CRECIMIENTO POR ABAJO DE 10ºC** | **TEMPERATURA PARA CRECIMIENTO**  **Y PRODUCCION DE TOXINA** | | |
| I | A, B, Fb | + | + | - | 30 - 37ºC |
| II | Bc, E, F b | + | - | + | 26 - 30ºC |

\* Algunas cepas de los tipos A y B pueden presentar subtipos A-B, A-F. B-A. B-F, cada una produce una toxina en mayor cantidad (representada por la primera letra del subtipo).

bNo común

c No común en Norteamérica

**TABLA No. 2 PRUEBA DE NEUTRALIZACION Y TOXICIDAD EN RATON**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **TUBO No.** | **Volumen de muestra (ml)** | **Antisuero** | **Volumen del Antisuero (ml)** | **Volumen iunoculado (ml)** |
| 1 | 1,2 | - | - | 0,5 |
| 2 | 1,2 | AntiA | 0,12 | 0,55 |
| 3 | 1,2 | AntiB | 0,12 | 0,55 |
| 4 | 1,2 | AntiE | 0,12 | 0,55 |
| 5 | 1,2 | Anti A, B, E | 0,12 | 0,55 |
| 6 | 1,2 | Tripsina | 0,12 | 0,55 |

**TABLA No 3 ENRIQUECIMIENTO**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **TUBO No.** | **MEDIO** | **TRATAMIENTO** |
| 1 | CMM | NINGUNO |
| 2 | CMM | CALOR |
| 3 | TPGYT | NINGUNO |
| 4 | TPGYT | ALCOHOL |

**B.21. DE LAS RECOMENDACIONES PARA EL TRATAMIENTO DE CONGELACION**

**B.21.1** Para los productos de la pesca con sospecha de contener parásitos y que se destine para ahumar en frío debe ser sometido a un tratamiento previo, conforme a los tiempos y temperaturas que se recomiendan a continuación:

|  |  |
| --- | --- |
| **Temperatura** | **Tiempo** |
| -20ºC | 7 días |
| -35ºC | 15 h |

**B.22. METODO DE PRUEBA PARA EL ANALISIS MICROBIOLOGICO DE ALIMENTOS ENVASADOS HERMETICAMENTE. ESTERILIZADOS COMERCIALMENTE**

**B.22.1 Fundamento**

**B.22.1.1** Examen microbiológico de latas no alteradas

Este examen tiene por objeto determinar la presencia de microorganismos viables latentes, que resistieron el tratamientotérmico debidamente aplicado y que en determinadas circunstancias pudieran desarrollarse, produciendo alteraciones en el alimento y representando un riesgo para el consumidor.

Los envasados, aun los bien procesados, pueden contener esporas de bacilos termofílicos, las cuales son muy resistentes al calor, pero no se desarrollan en las condiciones normales de almacenamiento y no producen problemas de descomposición del producto ni representan un peligro para el consumidor.

La prueba de esterilidad comercial, puede efectuarse por la observación y análisis del contenido del producto, su apariencia, color, olor, pH y examen microscópico.

Estas observaciones se hacen después de la incubación de las latas y siempre comparándolas con otras no incubadas.

Si es necesario efectuar el cultivo o si el producto después de incubarse presenta cualquier cambio, ya sea en apariencia, olor, color, pH, o bien presencia de gas o espuma, proceder como se indica en 5.1 o 5.2, dependiendo del pH del alimento.

**B.22.1.2** Examen microbiológico de latas alteradas

Este análisis tiene por objeto determinar el origen de la alteración, la cual puede ser causada por microorganismos que sobreviven al tratamiento térmico o por la introducción de éstos después del tratamiento, por defectos de las cerraduras o por golpes que lesionen el envase. Conociendo la naturaleza del alimento y su tratamiento, es posible predecir el tipo de organismo responsable de la alteración.

Numerosas investigaciones han demostrado que el tipo de alteraciones guarda relación con el grado de acidez del alimento procesado, por lo que éstos se dividen en dos grandes grupos:

**B.22.1.2.1** Alimentos de baja acidez, con pH > 4,6, entre los que se encuentran productos cárnicos, lácteos, marinos, algunos vegetales, guisados, sopas, etcétera.

**B.22.1.2.2** Alimentos ácidos, con pH < 4, 6, entre los que se encuentran tomates, frutas, jugos de cítricos, encurtidos, entre otros.

**B.22.2 Reactivos y materiales**

A continuación se presentan las fórmulas y los procedimientos para preparar los medios y reactivos empleados en el análisis microbiológico de los productos envasados herméticamente y sometidos a esterilización comercial. En caso de disponerse de fórmulas comerciales deshidratadas equivalentes, se deben seguir las instrucciones del fabricante.

**B.22.2.1** **Medios de cultivo y soluciones**

**B.2.2.1.1 Caldo glucosa púrpura de bromocresol (CGPB)**

|  |  |
| --- | --- |
| **FORMULA** | |
| Glucosa | 100 g |
| Extracto de carne | 30 g |
| Peptona (P. Ej. caseína) | 50 g |
| Púrpura de bromocresol | 20 ml |
| (1 | 6% en etanol) |
| Agua destilada | 1 0000 ml |

pH final = 7,0 ± 0,2

Disolver los ingredientes en el agua, ajustar el pH y envasar en tubos de 22 x 175 mm, en volúmenes de 12 a 15 ml. Esterilizar en autoclave a 121 ± 1°C por 15 min.

**B.21.2.1.2** Caldo de hígado picado o caldo carne cocida (CH o CCC)

|  |  |
| --- | --- |
| **FORMULA** | |
| Hígado o carne magra de res | 500,0 g |
| Agua destilada | 800,0 ml |
| Peptona | 10,0 g |
| Fosfato dipotásico | 1,0 g |
| Almidón soluble | 1,0 g |

pH final = 7,0 ± 0,2

Poner el hígado o la carne picada en agua, calentar a ebullición y dejar a fuego lento durante una hora. Enfriar, retirar la capa de grasa, ajustar el pH y hervir otros 10 min. Filtrar a través de gasa o manta de cielo, presionando para quitar el exceso de líquido. Enfriar y agregar al caldo la peptona, el fosfato y el almidón soluble. Ajustar el pH y llevar el volumen del caldo a 1 000 ml con agua destilada. Filtrar a través de papel filtro grueso; en este paso el caldo y la carne pueden guardarse en refrigeración, si el medio no puede terminarse el mismo día. Envasar en tubos de 22 x 175 mm volúmenes de 10 a 12 ml de caldo y depositar suficiente hígado o carne picada para que ocupe una altura de 1,25 cm del fondo del tubo. Esterilizar a 121± 1°C por 15 min.

**B.22.2.1.3 Caldo extracto de malta**

|  |  |
| --- | --- |
| **FORMULA** | |
| Extracto de malta | 6,0 g |
| Maltosa | 1,5 g |
| Glucosa | 6,0 g |
| Extracto de levadura | 1,0 g |
| Agua destilada | 1 000,0 ml |

pH final = 4,7 ± 0,2

Disolver los ingredientes con agitación constante. Ajustar el pH a 4,7 ±0,2, envasar en tubos de 22 x 175 mm en volúmenes de 12-15 ml. Esterilizar en autoclave a 121 ± 1°C por 15 min. Exponer al calor el menor tiempo posible.

**B.22.2.1.4** **Caldo ácido**

|  |  |
| --- | --- |
| **FORMULA** | |
| Proteosa peptona | 5,0 g |
| Extracto de levadura | 5,0 g |
| Glucosa | 5,0 g |
| Fosfato dipotásico | 4,0 g |
| Agua destilada | 1 000,0 ml |

pH final = 5,0 ± 0,2

Disolver los ingredientes en 1 l de agua y envasar en tubos de 22 x 175 mm en volúmenes de 12 a 15 ml. Esterilizar en autoclave a 121 ± 1°C por 15 min.

**B.22.2.1.5** **Agar papa dextrosa o dextrosa Sabouraud**

**B.22.2.1.5.1 Agar papa dextrosa**

|  |  |
| --- | --- |
| **FORMULA** | |
| Infusión de papa | 200,0 ml |
| Glucosa | 20,0 g |
| Agar | 15,0 g |
| Agua destilada | 1 000,0 ml |

pH final = 3,5

Lavar, pelar y rebanar papas de tamaño mediano (250 g). Hervir durante 30 min en 290 ml de agua destilada. Filtrar varias veces a través de gasa y algodón. En esta infusión, disolver los demás ingredientes. Añadir agua destilada hasta completar el volumen (1000 ml). Calentar a ebullición, hasta la disolución total de los ingredientes. Ajustar el pH a 5,6 ± 0,2. Distribuir en volúmenes de 100 ml y esterilizar en autoclave a 121 ± 1°C. Enfriar a 45 - 48°C y acidificar a pH 3,5 con solución estéril de ácido tartárico al 10% (aproximadamente 1,4 ml de ácido por cada 100 ml de medio). Una vez que se ha agregado el ácido tartárico, no se vuelve a calentar el medio.

**B.22.2.1.5.2** **Agar dextrosa Sabouraud**

|  |  |
| --- | --- |
| **FORMULA** | |
| Polipeptona o neopeptona | 10,0 g |
| Dextrosa | 40,0 g |
| Agar | 15,0 g |
| Agua destilada | 1 000,0 ml |

pH final = 5,6 ± 0,2

Calentar hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave a 118 - 121°C por 15 min, no exceder de 121 ± 1°C.

**B.22.2.1.6** **Agar hígado de ternera**

|  |  |
| --- | --- |
| **FORMULA** | |
| Infusión de hígado | 50,0 g |
| Infusión de ternera | 500,0 g |
| Proteosa peptona | 20,0 g |
| Neopeptona | 1,3 g |
| Triptona | 1,3 g |
| Glucosa | 5,0 g |
| Almidón soluble | 10,0 g |
| Caseína isoeléctrica | 5,0 g |
| Cloruro de sodio | 5,0 g |
| Nitrato de sodio | 2,0 g |
| Grenetina | 20,0 g |
| Agar | 15,0 g |
| Agua destilada | 1 000,0 ml |

pH final = 7,3 ± 0,2

Mezclar los ingredientes con agua destilada y calentar a ebullición hasta su disolución total. Ajustar el pH y esterilizar a 121 ± 1°C por 15 min.

**B.22.2.1.7** **Agar nutritivo**

|  |  |
| --- | --- |
| **FORMULA** | |
| Extracto de carne | 3,0 g |
| Peptona | 5,0 g |
| Agar | 15,0 g |
| Agua destilada | 1 000,0 ml |

pH final = 7,3 ± 0,2

Suspender los ingredientes en agua destilada y disolverlos por ebullición. Ajustar el pH. Distribuirlo en volúmenes adecuados en matraces o botellas y esterilizar a 121 ± 1°C por 15 min.

**B.22.2.1.8** **Solución estéril de ácido tartárico al 10%**

Disolver 10,0 g de Acido tartárico y llevar a 100 ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121 ± 1°C.

**B.22.2.1.9** **Colorante de azul de metileno**

Solución A Azul de metileno (pureza no < 90%) 0,3 g Etanol (95%) 90,0 ml

Solución B Solución 0,01% de hidróxido de 100,0 ml potasio

Mezclar A y B

**B.22.2.1.10 Colorante de cristal violeta**

Cristal violeta (pureza no < 90%) 2,0 g

Etanol (95%) 20,0 ml

Agua destilada 80,0 ml

**B.22.2.1.11** **Colorante de Gram**

Solución A Cristal violeta (pureza no < 90%) 2,0 g Etanol (95%) 20,0 ml

Solución B Oxalato de amonio 0,8 g Agua destilada 80,0 ml

Mezclar solución A y B dejar reposar 24 h al abrigo de la luz, filtrar por papel filtro grueso.

Solución de yodo para Gram

Yodo (cristales) 1,0 g

Yoduro de potasio 2,0 g

Agua destilada 300,0 ml

Mezclar el Yodo y el Yoduro de potasio en un mortero y triturar hasta fino polvo. Agregar 1 ml de agua y mezclar, agregar 5 ml de agua y mezclar, agregar 10 ml de agua y mezclar. Vaciar esta solución a un frasco reactivo, lavar el mortero y el pistilo con suficiente agua hasta completar los 300 ml.

**B.22.2.2** **Materiales**

Mecheros de Bunsen o Fischer.

Abrelatas sanitarios.

Pinzas, espátulas y cucharas.

Charolas.

Pipetas serológicas de 10 ml con tapón de algodón.

Pipetas despuntadas o tubos de 8 mm de diámetro con tapón de algodón.

Propipeta o bulbo para pipeta.

Tubos de cultivo de 18 x 150 o de 22 x 175 mm.

Embudos grandes de tallo corto.

Portaobjetos.

Cajas de Petri estériles.

Punzón para latas.

Asa de platino o nicromel en porta-asas.

Cepillo para lavar las latas.

Toallas o gasas estériles.

Solución de yodo al 4% (en etanol al 70%).

Sistema de anaerobiosis.

Varillas de vidrio de 20 cm de longitud y 3 mm de grueso, dobladas en ángulo recto de 5 cm en uno de sus extremos.

Azul de metileno, cristal violeta o equipo para tinción de Gram.

**B.22.3 Aparatos e instrumentos**

Autoclave con termómetro o manómetro.

Horno para esterilizar a 180°C.

Incubadoras con termómetro y termostato que evite variaciones > de 0,1°C.

Potenciómetro de escala expandida.

Microscopio compuesto.

**B.22.4 Preparación de las muestras**

**B.22.4.1** Llevar un registro en el laboratorio en donde se anoten:

**B.22.4.1.1** El número de lote (o señalar si éste no existe o está incompleto)

**B.22.4.1.2** Todos los datos importantes para la identificación del producto que aparezcan en la etiqueta; identificar la muestra en forma indeleble, antes deremover la etiqueta. Conservar el envase y la etiqueta.

**B.22.4.1.3** Los defectos físicos que se observen en el envase como abolladuras, golpes que lo deformen, oxidación, derrames, defectos aparentes de las cerraduras, abombamiento, etcétera.

Según su apariencia externa clasificarlas como sigue:

**B.22.4.2** Latas

**B.22.4.2.1** Latas planas o normales.

**B.22.4.2.2** Abombamiento ligero (Flipper), Grado I. Unicamente uno de los extremos de la lata se encuentra ligeramente abombado, pero puede comprimirse fácilmente.

**B.22.4.2.3** Abombamiento elástico (Springer), Grado II. Uno de los extremos se encuentra abombado; al presionarle el extremo opuesto se abulta.

**B.22.4.2.4** Hinchazón (Soft swell), Grado III. Ambos extremos se encuentran abombados, pero pueden comprimirse o ceden ligeramente a la presión.

**B.22.4.2.5** Hinchazón (Hard swell), Grado IV. Ambos extremos se encuentran abombados y no pueden comprimirse: la lata puede reventar.

**B.22.4.3** Frascos de vidrio

**B.22.4.3.1** Tapa normal

**B.22.4.3.2** Tapa abombada

**B.22.4.4** Incubación de los envases

**B.22.4.4.1** Incubación de productos en envases de apariencia normal.

La prueba más confiable para determinar la esterilidad comercial es la incubación del producto a temperaturas apropiadas y por un tiempo suficiente para que cualquier microorganismo que se encuentre pueda desarrollarse bajo las condiciones del producto envasado, dando origen a manifestaciones ya sea en el envase o en el producto. Incubar de 30 a 35°C por 10 a 14 días.

Observar diariamente los envases. La manifestación de crecimiento es la hinchazón en diferentes grados y en los envases de vidrio se pueden observar los cambios en el alimento o la formación de burbujas. En cuanto se detecte hinchazón en el producto o cualquier otra desviación suspender la incubación.

Al final del periodo de incubación, abrir las latas para descubrir descomposición ácida (flat sour), por cambios en el color, olor, consistencia y pH del alimento. Preparar extensiones, teñirlas con azul de metileno o tinción de Gram y observarlas microscópicamente. El hallazgo de cualquier anormalidad indica que el producto no está comercialmente estéril y se debe proceder como para los envases alterados.

**B.22.4.4.2** Incubación de envases sospechosos o alterados

Analizar de inmediato una o varias unidades de la muestra e incubar el resto de las latas que no presenten alteración evidente o con abombamiento de grado I de 30 a 35°C por 10 a 14 días.

Los envases con abombamiento muy evidente no deben incubarse.Aquellas que se clasifiquen como grado III o IV de no analizarse en el momento, deberán refrigerarse.

**B.22.4.5** Apertura de las latas o envases

**B.22.4.5.1** Area de trabajo

Se debe trabajar preferentemente en un gabinete de flujo laminar que proporcione un ambiente ultra-limpio, clase 100\*

La desinfección de la superficie de trabajo se puede hacer con alcohol o sales cuaternarias de amonio a la concentración recomendada por el fabricante. Posteriormente se debe poner a trabajar el flujo, 30 min antes de efectuar el trabajo.

Para controlar la eficacia del flujo, se deben poner como testigos cajas con medio de cultivo abiertas, a los lados y al centro del área de trabajo, durante todo el tiempo que dure la operación.

Si no se tiene el equipo necesario, se puede utilizar un cuarto o cubículo perfectamente limpio, lavado con agua y jabón, desinfectándolo con un agente bactericida apropiado. En este caso se trabajará entre dos mecheros Bunsen.

**B.22.4.5.2** Personal

El personal debe trabajar con bata limpia. Si tiene el pelo largo, debe usar turbante. El uso de mascarillas quirúrgicas es opcional. El personal enfermo con gripe o cualquier otro problema infeccioso no debe intervenir en el análisis.

**B.22.4.6** Preparación de latas o envasesnormales

Lavar el envase con un cepillo, usando agua caliente y jabón; enjuagar y dejar secar.

Remojar con un sanitizante durante 10 a 15 min, la tapa contraria a donde está grabado el lote. Escurrir el líquido y secar con la flama de un mechero.

Destapar con un abridor de latas sanitario estéril.

En las latas de cierre de anillo o dispositivos abre fácil, abrir por la cara opuesta.

\* El equipo debe proveer un ambiente libre de partículas de 0,3 micras con una eficiencia del 99,99% en un flujo de 100 pies3/min.

**B.22.4.6.1** Frascos de vidrio

Lavar la tapa del frasco y sumergirlo durante 15 min en una solución sanitizante, de manera que quede cubierta la tapa; esta solución puede ser cloro 100 mg/kg. Colocar un algodón estéril en torno a la tapa y con un punzón estéril hacer un orificio en el centro, a fin de que se pierda el vacío y pueda abrirse con facilidad. Abrir el frasco sin contaminar los bordes del mismo.

**B.22.4.7** Preparación de latas o envases alterados

Lavar el envase con un cepillo, con agua caliente y jabón; enjuagar y secar. Si la lata está muy inflada, mantener en el refrigerador antes de abrirla. Limpiar y sanitizar la tapa con una solución de cloro 100 mg/kg o yodo al 2% en alcohol al 70%; limpiar con una gasa estéril.

En latas muy infladas de pH muy ácido, es necesario hacer una prueba para hidrógeno, con objeto de conocer si el gas se debe a la acción del ácido sobre el metal.

Para ello, practicar una pequeña puntura en el centro de la tapa y recibir el gas en un tubo de ensayo invertido; inmediatamente ponerlo sobre la flama. Una pequeña explosión indica la presencia de hidrógeno. No debe flamearse directamente el orificio de la lata.

Para abrir latas infladas, colocar un embudo invertido con un algodón estérilsobre la tapa y picar con un picahielo estéril, hasta desalojar el gas antes de abrir la lata.

**B.22.5 Procedimiento**

Abrir la lata entre dos mecheros Bunsen o en el gabinete de flujo laminar vertical. Tomar porciones tanto del contenido sólido como del líquido; si es posible, homogeneizar. Utilizando utensilios adecuados a la naturaleza del producto (espátulas, pinzas, tubos de vidrio, pipetas, etcétera) transferir aproximadamente 2 g o 2 ml del producto a los tubos con el medio que se va a utilizar, dependiendo del pH del alimento.

Conservar una muestra en un frasco estéril, para cualquier aclaración o para efectuar pruebas biológicas. Hacer una extensión en un portaobjetos del contenido de la lata, ya que muchas veces los gérmenes causantes del deterioro mueren durante el almacenamiento y sólo el examen microscópico puede dar una idea de los microorganismos involucrados en la descomposición. Preparar las extensiones mediante una asa de platino. Si el alimento es sólido o muy espeso, agregar una pequeña cantidad de agua estéril. Si es muy grasoso, depositar sobre la extensión una pequeña cantidad de xilol con posterioridad a su fijación por calor.

Una vez tomada la muestra, anotar el estado del alimento: su olor, cambios en su color, consistencia, etcétera. No debe probarse. Determinar el pH y vaciar el contenido de la lata. Observar su interior, anotando el estado del barniz, la presencia de manchas, defectos del frasco o de la tapa, etcétera.

**B.22.5.1** Examen de alimentos envasados de baja acidez (pH > a 4,6)

Inocular aproximadamente 2 g o 2 ml, en cada uno de 4 tubos con caldo hígado, previamente calentado a 100°C para expulsar el oxígeno disuelto, y enfriar rápidamente.

Inocular asimismo, 4 tubos de caldo púrpura de bromocresol.

Incubar según el siguiente esquema:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Medio de cultivo** | **Tubos** | **Temperatura** | **Tiempo** | **InvestigaciOn** |
| Caldo hígado o CCC | 2 | 35°C | 96 h/120 h | Mesofílicos anaerobios |
| Caldo hígado o CCC | 2 | 55°C | 24 h/72 h | Termofílicos anaerobios |
| Caldo púrpura de bromocresol | 2 | 35°C | 96 h/120 h | Mesofílicos aerobios |
| Caldo púrpura de bromocresol | 2 | 55°C | 24 h/48 h | Termofílicos aerobios |

Transferir los alimentos líquidos por medio de una pipeta, utilizando un bulbo o propipeta. ¡Precaución! Tener ciudado al manipular el producto, incluso cuando provenga de envases aparentemente normales. ¡La Toxina botulínica puede estar presente! Observar los tubos diariamente, hasta el término del tiempo de incubación si no hay crecimiento en todos los tubos, descartar e informar como NEGATIVO.

**Cuadro 1 DIAGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE CULTIVO PARA ALIMENTOS ENLATADOS DE BAJA ACIDEZ (> 4,6).**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **CULTIVO ORIGINAL** | **TEMPERATURA** | **SUBCULTIVO** |  | **CULTIVO PURO** | **IDENTIFICACION** |
| CH o CCC  y  CGPB | 35°C  96/120 h | AN o AHT  Aeróbico  AN o AHT  Anaeróbico | Crecimiento  Crecimiento | Frotis  CH o CCC  Frotis  CH o CCC | Tinción de Gram  Anaeróbico  AN o AHT  Tinción de Gram  Aeróbico  AN o AHT |
| CH o CCC  y  CGPB | 55°C  24/72 h | AN o AHT  Aeróbico  AN o AHT  Anaeróbico | Crecimiento  Crecimiento | Frotis  CH o CCC  Frotis  CH o CCC | Tinción de Gram  Anaeróbico  Tinción de Gram  Aeróbico  AN o AHT |

CH = Caldo Hígado de Ternera AN = Agar Nutritivo

CCC = Caldo Carne Cocida AHT = Agar Hígado de Ternera

CGPB = Caldo Púrpura de Bromocresol

**DIAGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE CULTIVO PARA ALIMENTOS ENLATADOS ACIDOS (4,6).**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **CULTIVO ORIGINAL** | **TEMPERATURA** | **SUBCULTIVO** |  | **CULTIVO PURO** | **IDENTIFICACION** |
| CA, CEM | 30°C  96/120 h | AN, ADS o ADP  Aeróbico  AN, ADS o ADP  Anaeróbico | Crecimiento  Crecimiento | Frotis  CA, CEM  Frotis  CA, CEM | Tinción de Gram  Anaeróbico  AN, ADS o ADP  Tinción de Gram  Aeróbico  AN, ADS o ADP |
| CA | 55°C  24/72 h | AN  Aeróbico  AN  Anaeróbico | Crecimiento  Crecimiento | Frotis  CA  Frotis  CA | Tinción de Gram  Anaeróbico  AN  Tinción de Gram  Aeróbico  AN |

CA = Caldo Acido AN = Agar Nutritivo

CEM = Caldo Extracto de Malta ADS = Agar Dextrosa Sabouraud

ADP = Agar Papa Dextrosa

Si hay crecimiento, hacer frotis y teñir-resembrar a placas de agar hígado de ternera (sin yema de huevo) o agar nutritivo. Incubar a 35°C y 55°C una placa en aerobiosis y anaeróbico (ver cuadro 1) continuar la incubación a 35°C de caldo de hígado (CH) o caldo carne cocida (CCC) hasta un máximo de 5 días y guardar para determinación de toxina (cuando proceda).

Observar los agares y seleccionar un número representativo de los diferentes tipos de colonias y resembrar a CH y CCC a la temperatura y las condiciones según se especifica en el cuadro 1 (a 35°C por 96/120h y 55°C por 24/72h).

Expulsar el oxígeno inmediatamente antes de utilizar el CH que se va a incubar en anaerobiosis. Mantener viables los cultivos puros aislados. Hacer tinción de Gram.

**B.22.5.1.1** Cuando se presente crecimiento microbiano durante las pruebas para esterilidad comercial en un enlatado y no haya evidencia de descomposición del alimento, efectuar la confirmación de la siguiente forma:

**B.22.5.1.1.1** Obtener cultivos puros de la cepa o cepas encontradas.

**B.22.5.1.1.2** Seleccionar otro envase del mismo producto y el mismo lote que el anterior.

**B.22.5.1.1.3** En condiciones asépticas, practicar una pequeña perforación en el extremo de la lata o cerca del cierre.

**A.22.5.1.1.4** Inocular el producto con la cepa por abajo de la superficie.

**B.22.5.1.1.5** Flamear el orificio para crear vacío y sellar asépticamente con soldadura o un material similar.

**B.22.5.1.1.6** Después de inocular, incubar a 30-35°C durante 10 días.

**B.22.5.1.1.7** Abrir el enlatado y examinar el producto.

El aspecto del producto debe ser igual al que se observó en el envase de donde se obtuvo el cultivo. Si en el primer enlatado el producto fue de apariencia normal, pero se obtuvo crecimiento y en el segundo, inoculado con la flora microbiana aislada del primero, se encuentra el producto alterado (gas, consistencia diferente, olor, etcétera), debe considerarse que el primer enlatado era comercialmente estéril y que el crecimiento fue el resultado de un procedimiento deficiente por el laboratorio. Si se encuentra flora mixta únicamente en el CGPB, hacer informe de los tipos morfológicos. Si hay flora mixta en CH/CCC entre la cual se incluyan bacilos, hacer prueba toxina. Si se observan únicamente bacilos Gram positivo o Gram variable típicos del género *Bacillus* o *Clostridium* investigar presencia de esporas. En algunos casos las células vegetativas envejecidas pueden dar la apariencia de Gram negativo y debe considerarse como si fuera Gram positivo. Determinar la presencia de toxina. Esta prueba la podrá realizar un laboratorio oficialmente acreditado por las autoridades correspondientes.

**B.22.5.2** Examen microbiológico de alimentos envasados de acidez alta (pH < 4,6)

Inocular 2 g o 2 ml de alimento en 4 tubos de caldo ácido y 2 tubos de caldo extracto de malta.

Incubar según el esquema:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Medio de cultivo** | **Tubos** | **Temperatura** | **Tiempo** | **InvestigaciOn** |
| Caldo ácido | 2 | 30°C | 96 h | Lactobacilos, hongos y levaduras |
| Caldo ácido | 2 | 55°C | 48 h | Termofílicos de descomposición ácida |
| Caldo extracto de malta | 2 | 30°C | 96 h | Lactobacilos, hongos y levaduras |

**B.22.6 Expresión de resultados**

**B.22.6.1** Envases normales

Conviene extremar los cuidados al efectuar los ensayos, seleccionar las muestras e interpretar los resultados de las pruebas para demostrar la esterilidad comercial, ya que cualquier error basado en fallas de manipulación o interpretación, puede originar la destrucción de un lote comercialmente estéril, como contaminado. Al incubar el enlatado o al recibirse la lata, la presencia de hinchazón, principalmente cuando es muy acentuada, indica contaminación microbiana. Estas condiciones deben ser confirmadas demostrando la presencia de un gran número de microorganismos en las extensiones preparadas directamente a partir del alimento, descubriendo cambios en el aspecto del producto (consistencia, olor, coloración anormal) o variaciones en el pH, en comparación siempre con un producto normal. Los cultivos se practican por duplicado, cuando hay contaminación, en ambos tubos se debe hallar una flora similar a la encontrada en las extensiones de la muestra original. Encontrar sólo uno de los tubos de cultivo positivo y otro negativo, puede indicar una contaminación por manipulación en el laboratorio, a menos que se compruebe que existe el mismo tipo de flora que en la extensión de la muestra original.

A veces existe alguna dificultad en diferenciar partículas del alimento de microorganismos. Otras veces las levaduras o lactobacilos participan en la producción del alimento, como sucede en algunos productos obtenidos por fermentación. En estos casos, aunque ya no sean viables, los microorganismos pueden aparecer en la extensión, y sólo la experiencia y el conocimiento de los procesos permite interpretar correctamente los resultados.

**B.A.22.6.2** Envases alterados, con pH > de 4,6

**B.22.6.2.1** Presencia de mesofílicos aerobios

La flora presente en este caso, puede estar constituida por bacilos o ser mixta.

**B.22.6.2.1.1** Presencia de bacilos esporulados

Generalmente consiste en esporas termorresistentes de diferentes especies de bacilos. Regularmente el alimento no presenta alteraciones, ya que las esporas no pueden desarrollarse en condiciones de anaerobiosis; sin embargo, se han encontrado alteraciones producidas por bacilos con esporas resistentes (*Bacillus* *mesentericus* y *Bacillus subtilis*), en alimentos de acidez media, con tratamiento térmico adecuado, pero con vacío incompleto. También se ha encontrado *Bacillus ß nigrificans*, en conservas de betabeles con ennegrecimiento del producto.

**B.22.6.2.1.2** Presencia de flora mixta

La presencia de flora mixta se debe generalmente a la penetración de gérmenes, con posterioridad al proceso térmico, actuando como vehículo el agua de enfriamiento. La flora que se observa puede ser muy variada.

La penetración de los gérmenes se debe a defectos en las cerraduras, que permiten el paso de los microorganismos. Las latas generalmente se encuentran infladas y pueden mostrar defectos o derrames.

El pH y el aspecto del producto varían.

**B.22.6.2.2** Presencia de mesofílicos anaerobios

Consiste de anaerobios del género *Clostridium*, entre los que se encuentran *C*. *sporogenes*, *C.* *putrificans, C. hystoliticum, C. bifermentans, C. perfringens* y *C. botulinum*; este último es el de mayor importancia sanitaria, por producir una toxina muy potente. Las latas pueden estar parcialmente infladas y el producto parcialmente digerido; el olor es pútrido. El pH aumenta. En este caso, es necesario practicar la prueba en animales, tanto del producto como del filtrado del cultivo, para investigar la presencia de la toxina. Esta prueba la podrá realizar un laboratorio oficialmente acreditado por las autoridades correspondientes.

**B.22.6.2.3** Presencia de termofílicos aerobios

Consta de bacilos termofílicos estrictos o facultativos, que poseen esporas muy resistentes al calor (especie tipo *B. stearothermophilus*, causante de la descomposición ácida flat sour). Las latas son planas, sin alteración y con marcado aumento de la acidez del producto; puede haber olor anormal o enturbiamiento del líquido.

**B.22.6.2.4** Termofílicos anaerobios

Pertenecen también al género *Clostridium*, con esporas muy resistentes al calor.

La especie tipo *C*. *thermosaccharolyticum,* es un anaerobio estricto no productor de sulfhídrico; las latas se encuentran infladas.

Otro tipo de descomposición poco común, puede ser causada por C. nigrificans, que produce sulfhídrico con ennegrecimiento del producto.

**B.22.6.3** Interpretación de resultados en alimentos de acidez alta

**B.22.6.3.1** Presencia de mesofílicos aerobios

**B.22.6.3.1.1** Presencia de *Lactobacillus*. La descomposición por bacterias acidúricas no formadoras de esporas, puede deberse a varias especies del género *Lactobacillus*. Se han aislado *L. lycoperci, L. pentoaceticus, L. menitipolum* y *L. pleofructi*.

**B.22.6.3.1.2** Presencia de levaduras. El hallazgo de levaduras indica falta de procesamiento. Las latas contaminadas generalmente se presentan muy hinchadas y el olor del producto es característico de levadura (olor ácido). Entre las levaduras se han aislado esporas del género Torula.

**B.22.6.3.1.3** Presencia de hongos. Otro tipo de descomposición puede ser causada por hongos como *Byssochlamys fulva*, que forma esporas muy resistentes al calor. Se han encontrado también algunas cepas de Penicillium; en estos casos generalmente las latas se encuentran planas, sin alteración y el hongo crece en la superficie del producto.

**B.22.6.3.2** Mesofílicos anaerobios

*Clostridium pasteurianum* causa una descomposición poco frecuente, en que las latas se encuentran infladas y con olor butírico. Si se sospecha este tipo de contaminación, sembrar un tubo con medio o caldo ácido en anaerobiosis a 35°C.

**B.22.6.3.3** Termofílicos aerobios

La descomposición por termofílicos aerobios produce el tipo flat-sour, o sea la descomposición ácida. Las latas se encuentran planas y se observan cambios en el vacío; entre los gérmenes causantes está *B. coagulans*, que es el responsable de la descomposición de productos derivados del jitomate y de la producción de grumos de leche evaporada.

**B.22.6.3.4** Termofílicos anaerobios

La descomposición por termofílicos anaerobios es poco frecuente en productos ácidos. La producen anaerobios butíricos.

En productos de acidez muy alta, con pH inferior a 3, 7, como col agria, encurtidos, etcétera, la descomposición puede deberse a las bacterias ya señaladas, pero generalmente la acidez inhibe el desarrollo de gérmenes. En muchos casos, la hinchazón de la lata se debe a causas químicas, por formación de hidrógeno.

**B.22.6.4** Observaciones generales

Algunas veces se pueden encontrar cultivos negativos, procedentes de latas anormales, o de latas normales con productos descompuestos. Esto puede deberse a que la alteración ocurrió antes del procesamiento térmico del enlatado y han muerto los microorganismos que la originaron, o bien a que en un producto contaminado, los gérmenes murieron al agotarse el oxígeno o los nutrientes.

En estos casos, un examen microscópico del producto puede ayudar al diagnóstico.

**B.23. PROCEDIMIENTO AL TRASLUZ PARA LA DETECCION DE PARASITOS.**

**B.23.1** Para detectar los parásitos se coloca una muestra sobre una lámina acrílica de 5 mm de espesor, de 45% de traslúcidez y una fuente luminosa de 1500 lux a una distancia de 30 cm por encima de la lámina.

**B.23.2** La infestación parasítica podrá detectarse mediante este procedimiento al trasluz, por examen visual.