



**Cooperativa:  
"Planta comunitaria para el secado de productos pesqueros  
operada con energía termosolar para su integración en  
comunidades rurales"**

---

## **MONOGRAFÍAS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS**



**PLANTA COMUNITARIA PARA EL  
SECADO DE PRODUCTOS  
PESQUEROS OPERADA CON  
ENERGÍA TERMOSOLAR PARA SU  
INTEGRACIÓN EN  
COMUNIDADES RURALES**

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	10
1.1 OBJETIVO DE LA MONOGRAFÍA.....	10
<b>2. PREPARACION Y DILUCION DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANALISIS MICROBIOLÓGICO</b> .....	10
2.1 FUNDAMENTO.....	10
2.2 REACTIVOS Y MATERIALES.....	10
2.2.1 REACTIVOS .....	10
2.2.1.1 Preparación de reactivos.....	11
2.2.1.1.1 Solución de hidróxido de sodio 1,0 N.....	11
2.2.1.1.2 Soluciones diluyentes .....	11
2.2.1.1.2.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada).....	11
2.2.1.1.2.2 Agua peptonada .....	12
2.2.2 MATERIALES .....	12
<b>2.3 APARATOS E INSTRUMENTOS</b> .....	13
<b>2.4 PROCEDIMIENTO</b> .....	13
2.4.1 PREPARACIÓN DE LA DILUCIÓN PRIMARIA.....	13
2.4.1.1 Preparación de muestras sólidas o semisólidas .....	13
2.4.1.2 Preparación de las diluciones decimales adicionales. ....	14
2.4.1.3 Duración del procedimiento .....	15
<b>3. DETERMINACION DE BACTERIAS COLIFORMES. TECNICA DEL NUMERO MAS PROBABLE</b> .....	15
3.1 FUNDAMENTO.....	15
3.2 REACTIVOS Y MATERIALES .....	16
3.2.1 REACTIVOS .....	16
3.2.1.1 Soluciones diluyentes .....	16
3.2.1.1.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada).....	16
3.2.1.1.2 Agua peptonada .....	16
3.2.1.2 Medios de cultivo.....	17
3.2.1.2.1 Caldo lactosado .....	17

3.2.1.2.2 Lactosa bilis verde brillante .....	18
3.2.2 MATERIALES .....	19
3.2.3 APARATOS E INSTRUMENTOS .....	19
3.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA .....	20
3.4 PROCEDIMIENTO.....	20
3.4.1 PARA ALIMENTOS.....	20
3.4.2 PRUEBA PRESUNTIVA.....	20
3.4.3 PRUEBA CONFIRMATIVA .....	20
3.5 EXPRESION DE LOS RESULTADOS .....	21
3.6 INFORME DE LA PRUEBA .....	22
<b>4. METODO PARA LA CUENTA DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES EN PLACA .....</b>	<b>22</b>
4.1 FUNDAMENTO.....	22
4.2 REACTIVOS Y MATERIALES .....	23
4.2.1 REACTIVOS .....	23
4.2.1.1 Soluciones diluyentes .....	23
4.2.1.1.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada).....	23
4.2.1.1.2 Agua peptonada .....	23
4.2.2 MATERIALES .....	24
4.3 APARATOS E INSTRUMENTOS .....	25
4.4 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA .....	25
4.5 PROCEDIMIENTO.....	25
4.6 EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS .....	26
4.6.1 CÁLCULO DEL MÉTODO .....	26
4.7 INFORME DE LA PRUEBA .....	27
<b>5. METODO PARA LA DETERMINACION DE SALMONELLA EN ALIMENTOS. 27</b>	<b>27</b>
5.1 FUNDAMENTO.....	27
5.2 REACTIVOS Y MATERIALES .....	28
5.2.1 REACTIVOS .....	28
5.2.1.1 Medios de pre-enriquecimiento.....	28

5.2.1.1.1 Agua de peptona tamponada .....	28
5.2.1.1.2 Caldo lactosado .....	29
5.2.1.2 Caldo de enriquecimiento.....	29
5.2.1.2.1 Caldo selenito-cistina .....	29
5.2.1.2.2 Caldo tetrionato .....	30
5.2.1.2.3 Vassiliadis-Rappaport.....	30
5.2.1.2.3.1 Solución A.....	30
5.2.1.2.3.2 Solución B .....	31
5.2.1.2.3.3 Solución C .....	31
5.2.1.2.3.4 Medio completo .....	31
5.2.1.2.4 Caldo de Soya Trypticosa .....	32
5.2.1.2.5 Leche descremada reconstituida .....	32
5.2.1.2.6 Caldo soya trypticasa estéril adicionado con sulfito de potasio.	33
5.2.1.3 Medios de Aislamiento .....	33
5.2.1.3.1 Agar verde brillante (VB).....	33
5.2.1.3.2 Agar con sulfito de bismuto .....	34
5.2.1.3.3 Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) .....	34
5.2.1.3.4 Agar para Salmonella y Shigella (SS) .....	35
5.2.1.3.5 Agar entérico Hektoen.....	36
5.2.1.4 Medios para pruebas bioquímicas .....	37
5.2.1.4.1 Agar de tres azúcares y hierro (TSI) .....	37
5.2.1.4.2 Agar de hierro y lisina (LIA).....	38
5.2.1.4.3 Agar nutritivo .....	38
5.2.1.4.4 Medio de SIM (para Sulfuro, Indol y Movilidad).....	39
5.2.1.4.5 Agar citrato de Simmons .....	39
5.2.1.4.6 Caldo MR-VP (Rojo de metilo-Voges Proskauer).....	40
5.2.1.4.7 Caldo manitol .....	41
5.2.1.4.8 Caldo malonato .....	41
5.2.1.4.9 Caldo Urea .....	42
5.2.1.4.10 Caldo de urea rápido .....	42
5.2.1.4.11 Caldo infusión cerebro corazón .....	43

5.2.1.5 Soluciones.....	43
5.2.1.5.1 Solución verde brillante al 0,1% (1:1000).....	43
5.2.1.5.2 Solución de yodo-yoduro.....	44
5.2.1.5.3 Solución salina al 0,85% .....	44
5.2.1.5.4 Solución salina formalizada.....	44
5.2.1.5.5 Reactivo de Kovac .....	45
5.2.1.5.6 Solución de alfa-naftol al 5%.....	45
5.2.1.5.7 Solución de rojo de metilo .....	45
5.2.1.5.8 Solución de hidróxido de potasio al 40%.....	46
5.2.1.5.9 Solución de gelatinasa al 5% .....	46
5.2.1.6 Antisueros .....	46
5.2.2 MATERIAL.....	47
5.3 EQUIPO .....	47
5.4 PROCEDIMIENTO .....	48
5.4.1 PREPARACIÓN DE LOS ALIMENTOS PARA EL AISLAMIENTO DE SALMONELLA .....	48
5.4.1.1 Procedimiento general para la preparación de muestras .....	48
5.4.2 AISLAMIENTO DE SALMONELLA.....	49
5.4.3 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA.....	50
5.4.3.1 Prueba de ureasa .....	51
5.4.3.2 Identificación serológica .....	52
5.4.3.2.1 Ensayo de los antígenos somáticos de Salmonella (Antisuero polivalente O).....	52
5.4.3.2.2 Si se requiere, practicar el ensayo de los antígenos flagelares de Salmonella (Antisuero polivalente H) .....	53
5.4.4 PRUEBAS BIOQUÍMICAS COMPLEMENTARIAS .....	53
5.5 CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS .....	55
5.6 INFORME DE RESULTADOS.....	56
<b>6. METODO PARA LA DETERMINACION DE <i>Staphylococcus aureus</i> EN ALIMENTOS.....</b>	<b>56</b>
6.1 FUNDAMENTO.....	56

6.2 REACTIVOS Y MATERIALES.....	56
6.2.1 REACTIVOS .....	56
6.2.1.1 Soluciones diluyentes .....	56
6.2.1.1.1 Solución reguladora de fosfatos (Solución concentrada) .....	57
6.2.1.1.2 Agua peptonada.....	57
6.2.1.2 Medios de cultivo .....	58
6.2.1.2.1 Medio de Baird-Parker .....	58
6.2.1.2.2 Medio base de Baird-Parker.....	58
6.2.1.2.3 Solución de telurito.....	59
6.2.1.2.4 Emulsión de yema de huevo .....	59
6.2.1.2.5 Solución salina isotónica .....	60
6.2.1.2.6 Caldo de infusión cerebro-corazón (BHI) .....	60
6.2.1.2.7 Ácido desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera.....	60
6.2.1.2.8 Solución de cloruro de calcio anhidro 0,01 M (PM: 110.99) .....	61
6.2.1.2.9 Solución de azul de toluidina 0,1 M.....	61
6.2.1.2.10 Solución amortiguadora 0,05 M Tris-(hidroximetil-aminometano) (PM: 121,1) .....	62
6.2.1.3 Reactivo biológico:.....	62
6.2.1.3.1 Plasma de conejo.....	62
6.2.2 MATERIALES .....	62
6.3 APARATOS .....	63
6.4 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	63
6.5 PROCEDIMIENTO .....	64
6.5.1 PRUEBA DE COAGULASA.....	65
6.5.2 Prueba de termonucleasa.....	65
6.6 CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS .....	66
6.6.1 CÁLCULO.....	66
6.6.2 EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS.....	66
<b>7. TECNICA DEL NUMERO MAS PROBABLE. DETERMINACION DE BACTERIAS COLIFORMES, COLIFORMES FECALES Y ESCHERICHIA COLI POR LA TECNICA DE DILUCIONES EN TUBO MULTIPLE .....</b>	<b>67</b>

7.1 FUNDAMENTO.....	67
7.2 EQUIPO, MATERIALES Y REACTIVOS.....	68
7.3 PROCEDIMIENTOS .....	68
7.3.1 USO DE TABLAS DE NMP CON 95% DE LÍMITE DE CONFIANZA.....	68
7.4 CÁLCULO APROXIMADO DEL NMP Y 95% DE LÍMITE DE CONFIANZA .	69
<b>8. DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES, COLIFORMES FECALES Y ESCHERICHIA COLI POR LA TÉCNICA DE DILUCIONES EN TUBO MÚLTIPLE .....</b>	<b>71</b>
8.1 FUNDAMENTO.....	71
8.2 EQUIPO Y MATERIALES .....	71
8.2.1 MEDIOS DE CULTIVO.....	72
8.2.1.1 Caldo lauril.....	72
8.2.1.2 Preparación de caldo lauril triptosa (consultar tabla del apartado B.17.3.3.2 de la Norma, NOM-242-SSA1-2009) .....	73
8.2.1.3 Caldo EC (E. coli.).....	73
8.2.1.4 Agar McConkey.....	73
8.2.1.5 Agar eosina azul de metileno de Levin (EMB-L) .....	74
8.2.1.6 Caldo triptona al 1% (triptófano).....	75
8.2.1.7 Caldo MR-VP.....	75
8.2.1.8 Caldo citrato de Koser.....	76
8.2.2 REACTIVOS .....	76
8.2.2.1 Reactivo de Kovacs.....	76
8.2.2.1.1 Para la prueba de indol .....	77
8.2.2.2 Solución 1 .....	77
8.2.2.3 Solución 2 .....	77
8.2.2.3.1 Prueba de Voges-Proskauer (VP).....	77
8.2.3 REACTIVOS PARA LA COLORACIÓN DE GRAM .....	78
8.2.3.1 Cristal violeta.....	78
8.2.3.1.1 Solución A .....	78
8.2.3.1.2 Solución B .....	78
8.2.3.2 Indicador rojo de metilo (R44) .....	78



8.2.3.3 lodo de Gram.....	79
8.2.4 PROCEDIMIENTO PARA LA TINCIÓN DE GRAM .....	80
8.2.5 MEDIO EC-MUG.....	80
8.3 PROCEDIMIENTO .....	80
8.3.1 ALIMENTOS .....	80
8.3.1.1 Prueba presuntiva.....	80
8.3.1.2 Prueba confirmatoria .....	81
8.4 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS .....	81
8.5 CÁLCULOS.....	81
<b>9. MÉTODO PARA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA (MESOFILOS) (NOM-092-SSA1-1994).....</b>	<b>82</b>
9.1 INTRODUCCIÓN .....	82
9.2 OBJETIVO .....	82
9.3 REACTIVOS Y MATERIAL .....	82
9.3.1 MEDIO DE CULTIVO.....	82
9.3.1.1 Agar Triptona-Extracto de Levadura (agar para cuenta estándar) ...	82
9.3.2 MATERIALES .....	83
9.3.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA .....	84
9.3.3.1 Solución (diluyente).....	84
9.3.3.1.1 Agua peptonada.....	84
9.3.3.2 Procedimiento.....	84
9.3.3.2.1 Preparación de la dilución primaria (Muestras solidas) .....	84
9.3.3.2.2 Diluciones decimales.....	85
9.4 PROCEDIMIENTO .....	85
9.5 EXPRESIÓN DE RESULTADOS .....	86
9.5.1 CÁLCULO DEL MÉTODO .....	86
9.6 INFORME DE LA PRUEBA.....	89
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>90</b>
<b>11. REFERENCIAS .....</b>	<b>92</b>

## **1. INTRODUCCIÓN**

Esta monografía ha sido elaborada como documento de consulta para una empresa de alimentos, siguiendo los lineamientos establecidos en las Normas Oficiales Mexicanas NOM-242-SSA1-2009 y NOM-092-SSA1-1994. Este documento reproduce textualmente los apartados para la realización de las pruebas microbiológicas que contempla la norma “NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba” y la “NOM-092-SSA1-1994 Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa”. Los derechos de autor de este contenido pertenecen exclusivamente al Estado Mexicano, por lo que no se pretende infringir los derechos de autor. La finalidad es asegurar el cumplimiento de especificaciones sanitarias en la preparación, dilución de muestras y en la realización de análisis microbiológicos para coliformes totales y fecales, Salmonella spp., Staphylococcus aureus, E. coli y mesófilos totales.

### **1.1 OBJETIVO DE LA MONOGRAFÍA**

Establecer los procedimientos para la preparación y dilución de muestras de alimentos para análisis microbiológicos, así como detallar los métodos de prueba específicos para detectar coliformes totales y fecales, Salmonella spp., Staphylococcus aureus, E. coli y mesófilos totales, de acuerdo con la NOM-242-SSA1-2009.

## **2. PREPARACION Y DILUCION DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANALISIS MICROBIOLOGICO**

### **2.1 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.

### **2.2 REACTIVOS Y MATERIALES**

#### **2.2.1 REACTIVOS**

Los reactivos deben ser grado analítico. El agua debe ser agua destilada.

### **2.2.1.1 Preparación de reactivos**

#### **2.2.1.1.1 Solución de hidróxido de sodio 1,0 N**

##### **FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Hidróxido de sodio	4.0 g
Agua	100.0 mL

##### **Preparación**

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

### **2.2.1.2 Soluciones diluyentes**

#### **2.2.1.2.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada).**

##### **FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
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  $121^{\circ} \pm 1,0$  °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  $121^{\circ} \pm 1,0$  °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.

### 2.2.1.2.2 Agua peptonada

#### FORMULA

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
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  $7 \pm 0,1$  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  $121 \pm 1,0$  °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.

#### 2.2.2 MATERIALES

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.

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.

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  $121 \pm 1,0$  °C.

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

## **2.3 APARATOS E INSTRUMENTOS**

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  $0,1^{\circ}\text{C}$  y que mantenga la temperatura a  $45 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

Licuada de una o dos velocidades controladas por un reóstato o bien un homogeneizador peristáltico (Stomacher).

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

Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g.

## **2.4 PROCEDIMIENTO**

### **2.4.1 PREPARACIÓN DE LA DILUCIÓN PRIMARIA.**

#### ***2.4.1.1 Preparación de muestras sólidas o semisólidas***

Las muestras sólidas y semisólidas congeladas, deben descongelarse en refrigeración de 4 a  $8^{\circ}\text{C}$  durante 18 horas y no más de 24 horas antes de proceder a su análisis.

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

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

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.

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.

#### ***2.4.1.2 Preparación de las diluciones decimales adicionales.***

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.

Mezclar cuidadosamente cada botella de diluyente manualmente con 25 movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo de 7 segundos.

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.

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.

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.

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 Norma Oficial Mexicana correspondiente.

#### ***2.4.1.3 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.

### **3. DETERMINACION DE BACTERIAS COLIFORMES. TECNICA DEL NUMERO MAS PROBABLE**

#### **3.1 FUNDAMENTO**

El método se basa en que las bacterias coliformes, fermentan la lactosa incubada a  $35 \pm 1^\circ \text{C}$  durante 24 a 48 horas, resultando una producción de ácidos y gas el cual se manifiesta en las campanas de fermentación.

## 3.2 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.

### 3.2.1 REACTIVOS

#### 3.2.1.1 Soluciones diluyentes

##### 3.2.1.1.1 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  $121 \pm 1,0$  °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  $121 \pm 1$  °C. Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

##### 3.2.1.1.2 Agua peptonada

#### FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Peptona	4.0 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  $121 \pm 1,0$  °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.

### 3.2.1.2 Medios de cultivo

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

Caldo laurilsulfato 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.

#### 3.2.1.2.1 Caldo lactosado

### FORMULA

Ingredientes	Medios de concentración Sencilla
Triptosa	20.0 g
Lactosa	5.0 g
Fosfato dipotásico	2.75 g
Fosfato monopotásico	2.75 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Lauril sulfato de sodio	0.1 g

Agua destilada

1.0 L

### **Preparación**

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  $6,9 \pm 0,2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ . 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  $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ . 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.

#### **3.2.1.2.2 Lactosa bilis verde brillante**

##### **FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Medios de concentración Sencilla</b>
Peptona	10.0 g
Lactosa	10.0 g
Sales biliares	20.0 g
Verde brillante	0.0133 g
Agua destilada	1.0 L

### **Preparación**

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  $25^{\circ}\text{C}$ . 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.

### **3.2.2 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:

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.

### **3.2.3 APARATOS E INSTRUMENTOS**

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.

### **3.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

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

### **3.4 PROCEDIMIENTO**

#### **3.4.1 PARA ALIMENTOS**

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

#### **3.4.2 PRUEBA PRESUNTIVA**

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.

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.

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.

Incubación. Incubar los tubos a  $35 \pm 0,5$  °C por  $24 \pm 2$  horas y observar si hay formación de gas, en caso contrario prolongar la incubación hasta  $48 \pm 2$  horas

#### **3.4.3 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  $35 \pm 0,5$  °C por  $24 \pm 2$  horas o si la formación de gas no se observa en este tiempo, prolongar la incubación por  $48 \pm 2$  horas.

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.

### **3.5 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.

En la figura 1 se muestran 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 de la figura 1) 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 de la figura 1).

E J E M P L O	Número de tubos positivos obtenidos de tres						NMP				
	Tubos incubados, para las siguientes cantidades de muestra inoculada por tubo										
	Producto										
	Líquido	(ml)	10	1	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	Producto	Otros		
Otros Productos	(g)	1	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	Líquido	Otros			
Mayor dilución = menor concentración											
							ml <sup>-1</sup>	g <sup>-1</sup>			
1			3	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	0	15	(5)	150	(6)
2			3	<u>3</u>	<u>3</u>	0	0	24	(5)	240	(6)
3			2	2	<u>1</u>	<u>1</u>	0	7	(6)	70	(7)
4			<u>3</u>	<u>3</u>	<u>0</u>	0	0	2,4	(4)	24	(5)
5			<u>2</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	1	0	0,21	(4)	2,1	(5)

Figura 1. Ejemplo de la selección de los resultados positivos para el cálculo del NMP

### 3.6 INFORME DE LA PRUEBA

Consultar las tablas que se encuentran en la "NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba" en el apartado correspondiente Informar "Número más probable (NMP) de coliformes por gramo o mililitro de muestra". En caso de muestras de agua informar NMP/100 ml.

## 4. METODO PARA LA CUENTA DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES EN PLACA

### 4.1 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.

## 4.2 REACTIVOS Y MATERIALES

### 4.2.1 REACTIVOS

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

#### 4.2.1.1 Soluciones diluyentes

##### 4.2.1.1.1 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  $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  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  $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ . Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

##### 4.2.1.1.2 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  $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ . 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  $5^{\circ}\text{C}$  por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición.

#### **4.2.2 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:

En autoclave, durante 15 minutos como mínimo a  $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ .

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.



### **4.3 APARATOS E INSTRUMENTOS**

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  $0,1^{\circ}\text{C}$  y que mantenga la temperatura a  $45 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ .

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

Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de  $\pm 1,0^{\circ}\text{C}$ , provista con termómetro calibrado.

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

Registrador mecánico o electrónico.

Microscopio óptico.

Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH a  $25^{\circ}\text{C}$ .

### **4.4 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

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

### **4.5 PROCEDIMIENTO**

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.

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

Verter de 15 a 20 ml del medio RVBA fundido y mantenido a  $45 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  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.

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.

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

Después de que está el medio completamente solidificado en la caja, verter aproximadamente 4 ml del medio RVBA a  $45 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  en la superficie del medio inoculado. Dejar que solidifique.

Invertir las placas y colocarlas en la incubadora a  $35^{\circ}\text{C}$ , durante  $24 \pm 2$  horas.

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

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.

## **4.6 EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS**

### **4.6.1 CÁLCULO DEL MÉTODO**

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.

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.

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.

## **4.7 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".

## **5. METODO PARA LA DETERMINACION DE SALMONELLA EN ALIMENTOS**

### **5.1 FUNDAMENTO**

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

Pre-enriquecimiento, 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.

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

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.

Identificación bioquímica, este paso permite la identificación générica de los cultivos de Salmonella y la eliminación de cultivos sospechosos falsos.

Serotipificación, es una técnica serológica que permite la identificación específica de un cultivo.

## **5.2 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.

### **5.2.1 REACTIVOS**

#### ***5.2.1.1 Medios de pre-enriquecimiento***

##### **5.2.1.1.1 Agua de peptona tamponada**

#### **FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Peptona	10.0 g
NaCl	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  $121 \pm 1^\circ\text{C}$

### 5.2.1.1.2 Caldo lactosado

#### FORMULA

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Extracto de carne	3.0 g
Peptona	5.0 g
Lactosa	5.0 g
Agua	1.0 L

#### Preparación

Disolver los ingredientes en agua, calentando a 65°C. Distribuir en porciones de 225 ml, en frascos de 500 ml, revisar pH ajustar a 6.9±0.2. Esterilizar durante 15 min a 121°C ± 1°C.

### 5.2.1.2 Caldo de enriquecimiento

#### 5.2.1.2.1 Caldo selenito-cistina

#### FORMULA

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Triptona o polipeptona	5.0 g
Lactosa	4.0 g
Fosfato disódico	10.0 g
Selenito ácido de sodio	4.0 g
L-cistina	0.01 g
Agua destilada	1.0 L

#### 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. Revisar pH, ajustar a  $7.0 \pm 0.2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ . 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  $110^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , tomando entonces un color salmón.

#### 5.2.1.2.2 Caldo tetrionato

##### FORMULA

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Proteosa, peptona o tristona	5.0 g
Sales biliares	1.0 g
Carbonato de calcio	10.0 g
Trisulfato de sodio pentahidratado	30.0 g
Agua destilada	1.0 L

#### 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. Revisar pH ajustar a  $7.0 \pm 0.1$ . 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.

#### 5.2.1.2.3 Vassiliadis-Rappaport

##### 5.2.1.2.3.1 Solución A

##### FORMULA

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
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.

#### **5.2.1.2.3.2 Solución B**

##### **FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
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.

#### **5.2.1.2.3.3 Solución C**

##### **FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Oxalato de verde malaquita	0.4 g
Agua destilada	100.0 mL

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

#### **5.2.1.2.3.4 Medio completo**

##### **FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
---------------------	-------------------

Solución A	1000 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.

#### **5.2.1.2.4 Caldo de Soya Trypticasa**

##### **FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Trypticasa o triptosa	17.0 g
Fitona	3.0 g
Glucosa	2.5 g
Cloruro de sodio	2.5 g
Agua destilada	1.0 L

### **Preparación**

Disolver los ingredientes en 1 litro de agua destilada, calentando lentamente hasta su disolución completa. Ajustar el pH si es necesario, de tal manera que después de la esterilización sea de  $7.3 \pm 0.2$ . Distribuir porciones de 225 ml dentro de matraces de 500 ml y esterilizar en autoclave durante 15 min a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

#### **5.2.1.2.5 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  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 15 min. El volumen final debe corregirse para mantener 225 ml.

#### **5.2.1.2.6 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.

### **5.2.1.3 Medios de Aislamiento**

#### **5.2.1.3.1 Agar verde brillante (VB)**

##### **FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Extracto de levadura	3.0 g
Polipeptona (Proteosa peptona No. 3)	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Lactosa	10.0 g
Sacarosa	10.0 g
Rojo de fenol	0.0800 g
Agar	20.0 g
Verde brillante	0.0125 g
Agua	1.0 L

#### **Preparación**

Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada y calentar a ebullición, hasta disolución completa. Ajustar el pH a  $6.9 \pm 0.2$ . Esterilizar en autoclave por 15 min a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . El sobrecalentamiento del medio disminuye su selectividad. Enfriar el medio a  $50^{\circ}\text{C}$  y distribuirlo en cajas de petri estériles. El aspecto del medio es oscuro, de color marrón.

### 5.2.1.3.2 Agar con sulfito de bismuto

#### FORMULA

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Extracto de carne de res	5.0 g
Mezcla de peptonas	10.0 g
Glucosa	5.0 g
Fosfato disódico (anhidro)	5.0 g
Sulfato ferroso (anhidro)	0.3 g
Sulfito de busmuto	8.0 g
Verde Brillante	0.025 g
Agar	20.0 g
Agua	1.0 L

#### Preparación

Suspender los ingredientes en un litro de agua. Calentar hasta su disolución completa, agitando frecuentemente. Ajustar el pH a  $7.6 \pm 0.2$ . Enfriar a  $45^{\circ}\text{C}$  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.

### 5.2.1.3.3 Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)

#### FORMULA

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Xilosa	3.75 g

L-Lisina	5.0 g
Lactosa	7.5 g
Sacarosa	7.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Rojo fenol	0.08 g
Agar	15.0 g
Desoxicolato de sodio	2.5 g
Citrato férrico-amónico	0.80 g
Tiosulfato de sodio	6.80 g
Agua destilada	1.0 L

### **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 a 6.9 ± 0.2. 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.

#### **5.2.1.3.4 Agar para Salmonella y Shigella (SS)**

##### **FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Extracto de carne	5.0 g
Polipeptona *	5.0 g
Lactosa	10.0 g
Sales biliares	8.5 g
Citrato de sodio dihidratado	8.5 g
Tiosulfato de sodio pentahidratado	8.5 g
Citrato férrico	1.0 g

Agar	13.5 g
Rojo neutro	0.025 g
Verde brillante	0.330 mg
Agua destilada	1.0 L

\* 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 a  $7.0 \pm 0.2$ . 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.

#### **5.2.1.3.5 Agar entérico Hektoen**

### **FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Proteosa peptona	12.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Lactosa	12.0 g
Sacarosa	12.0 g
Salicina	2.0 g
Sales biliares	9.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Tiosulfato de sodio	5.0 g
Citrato amónio férrico	1.5 g
Azul de bromotimol	0.064 g
Fuscina ácida	0.1 g
Agar	13.5 g
Agua	1.0 L

## Preparación

Suspender los ingredientes en agua destilada, hervir con agitación hasta completa disolución del agar. Ajustar el pH a  $7.5 \pm 0.2$ . No sobrecalentar. Dejar enfriar a  $55 - 60$  °C y distribuir en cajas de petri estériles en condiciones asépticas.

### 5.2.1.4 Medios para pruebas bioquímicas

#### 5.2.1.4.1 Agar de tres azúcares y hierro (TSI)

##### FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Peptona de carne *	1.0 g
Peptona de caseína*	1.0 g
Cloruro de sodio	0.5 g
Lactosa	1.0 g
Sacarosa	1.0 g
Glucosa	0.1 g
Agar	1.3 g
Rojo de fenol	2.5 mg
Sulfato ferroso amónico-Pentahidratado	20.0 mg
Tiosulfato de sodio	20.0 mg
Agua destilada	100.0 mL

\* 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  $60^{\circ}\text{C}$  y ajustar el pH a  $7.3 \pm 0.2$ . Distribuir en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  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.

#### 5.2.1.4.2 Agar de hierro y lisina (LIA)

##### FORMULA

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Peptona de gelatina	0.5 g
Extracto de levadura	0.3 g
Glucosa	0.1 g
L-lisina	1.0 g
Citrato férrico-amónico	50.0 mg
Tiosulfato de sodio anhidro	4.0 mg
Púrpura de bromocresol	2.0 mg
Agar	1.5 g
Agua destilada	100.0 mL

#### 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 a  $6.7 \pm 0.2$ . Distribuir en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm, con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  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.

#### 5.2.1.4.3 Agar nutritivo

##### FORMULA

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
---------------------	-------------------

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	5.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1.0 L

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  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 15 min. Inclinar los tubos antes que el agar solidifique.

#### 5.2.1.4.4 Medio de SIM (para Sulfuro, Indol y Movilidad)

##### FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne	3.0 g
Peptona	30.0 g
Hierro peatonizado	0.2 g
Tiosulfato de sodio	0.025 g
Agua destilada	1.0 L

##### Preparación

Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta lograr una disolución completa. Enfriar a  $50^{\circ}\text{C}$  y ajustar el pH a  $7.3 \pm 0.2$ . Distribuir el medio en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. Se dejan enfriar los tubos en posición vertical.

#### 5.2.1.4.5 Agar citrato de Simmons

##### FORMULA

Ingredientes	Cantidades
--------------	------------

Fosfato de amonio	1.0 g
Fosfato dipotásico	1.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Citrato de sodio	2.0 g
Sulfato de magnesio	0.2 g
Azul de bromotimol	0.08 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1.0 L

### Preparación

Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta lograr una disolución completa. Ajustar el pH  $6.8 \pm 0.2$ . Distribuir el medio en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. Dejar enfriar los tubos en posición inclinada.

#### 5.2.1.4.6 Caldo MR-VP (Rojo de metilo-Voges Proskauer)

##### FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Peptona	7.0 g
Dextrosa	5.0 g
Difosfato de potasio	5.0 g
Agua destilada	1.0 L

### Preparación

Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta lograr una disolución completa. Ajustar el pH a  $6.9 \pm 0.2$ . Distribuir el medio en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.



#### 5.2.1.4.7 Caldo manitol

##### FORMULA

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Extracto de carne	1.0 g
Proteosa peptona	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Rojo de fenol	0.018 g
Manitol	10.0 g
Agua destilada	1.0 L

##### Preparación

Suspender 26 g del medio deshidratado en un litro de agua, mezclar y ajustar el pH a  $7.4 \pm 0.2$ . Distribuir en volúmenes de 2 a 3 ml en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.

#### 5.2.1.4.8 Caldo malonato

##### FORMULA

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Extracto de levadura	1.0 g
Sulfato de amonio	2.0 g
Fosfato dipotásico	0.6 g
Fosfato monopotásico	0.4 g
Cloruro de sodio	2.0 g
Malonato	3.0 g
Glucosa	0.250 g
Azul de bromotimol	0.025 g
Agua destilada	1.0 L

##### Preparación

Suspender los ingredientes en agua, mezclar y ajustar el pH a  $6.7 \pm 0.2$ . Distribuir en tubos de 13 x 100 mm en cantidades de 3 ml. Esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.

#### 5.2.1.4.9 Caldo Urea

##### FORMULA

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Urea	20.0 g
Extracto de levadura	0.10 g
Fosfato monopotásico	9.10 g
Fosfato disódico	9.50 g
Rojo de fenol	0.01 g
Agua destilada	1.0 L

##### Preparación

Disolver los ingredientes en agua destilada y ajustar el pH a  $6.8 \pm 0.2$ . NO CALENTAR. Esterilizar por filtración a través de membrana  $0,45 \mu\text{m}$  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.

#### 5.2.1.4.10 Caldo de urea rápido

##### FORMULA

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Urea	20.0 g
Extracto de levadura	0.10 g
Fosfato monopotásico	0.091 g

Fosfato disódico	0.095 g
Rojo de fenol	0.01 g
Agua destilada	1.0 L

### **Preparación**

Disolver los ingredientes en agua destilada y ajustar el pH a  $6.8 \pm 0.2$ . NO CALENTAR. Esterilizar por filtración a través de membrana 0,45  $\mu\text{m}$ . Distribuir asépticamente de 1,5 a 3 ml en tubos estériles de 13 x 100 mm.

#### **5.2.1.4.11 Caldo infusión cerebro corazón**

##### **FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Infusión cerebro corazón	200.0 g
Infusión de corazón de res	250.0 g
Proteosa peptona	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato disódico dodecahidratado	2.5 g
Dextrosa	2.0 g
Agua destilada	1.0 L

### **Preparación**

Disolver los ingredientes en agua destilada, calentar suavemente y ajustar el pH a  $7.4 \pm 0.2$ . Distribuir y esterilizar a  $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  durante 15 min.

#### **5.2.1.5 Soluciones**

##### **5.2.1.5.1 Solución verde brillante al 0,1% (1:1000)**

##### **FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Verde brillante	0.1 g
Agua destilada estéril	100.0 mL

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

#### **5.2.1.5.2 Solución de yodo-yoduro**

##### **FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Cristal de yodo	6.0 g
Yoduro de potasio	6.0 g
Agua destilada	100.0 mL

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

#### **5.2.1.5.3 Solución salina al 0,85%**

##### **FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Cloruro de sodio	0.85 g
Agua destilada	100.0 mL

Disolver el cloruro de sodio en el agua y esterilizar a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.

#### **5.2.1.5.4 Solución salina formalizada**

##### **FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Solución de formaldehído (36-38%)	6.0 mL

Cloruro de sodio	8.5 g
Agua destilada	1.0 L

Disolver 8,5 g de cloruro de sodio en 1 litro de agua destilada. Esterilizar a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. Enfriar a temperatura ambiente. Adicionar 6 ml de la solución de formaldehído. No esterilizar después de la adición de formaldehído.

#### 5.2.1.5.5 Reactivo de Kovac

##### FORMULA

Ingredientes	Cantidades
p-dimetil-aminobenzaldehido	5.0 g
Alcohol amílico	75.0 mL
Ácido clorhídico concentrado	25.0 mL

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

#### 5.2.1.5.6 Solución de alfa-naftol al 5%

##### FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Alfa-naftol	5.0 g
Alcohol	100.0 mL

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

#### 5.2.1.5.7 Solución de rojo de metilo

##### FORMULA

Ingredientes	Cantidades
--------------	------------

Rojo metilo	0.10 g
Alcohol etílico	300.0 mL
Agua destilada c. b. p.	500.0 mL

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

#### **5.2.1.5.8 Solución de hidróxido de potasio al 40%**

##### **FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Hidróxido de potasio	40.0 g
Agua destilada	100.0 mL

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

#### **5.2.1.5.9 Solución de gelatinasa al 5%**

##### **FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Gelatinasa	5.0 g
Agua	100.0 mL

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

#### **5.2.1.6 Antisueros**

Antisuero polivalente somático (O)

Antisuero polivalente flagelar (H)

Antisuero Vi

## 5.2.2 MATERIAL

Matraces Erlenmeyer de 500 ml

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

Ángulos 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:

Autoclave, durante 15 min como mínimo a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

## 5.3 EQUIPO

Incubadora con termostato para evitar variaciones mayores de  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$  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

Licuada de una o dos velocidades controladas por un reóstato, con vasos esterilizables (vidrio o aluminio).

Mecheros Bunsen o Fisher

Potenciómetro

## **5.4 PROCEDIMIENTO**

### **5.4.1 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.

#### ***5.4.1.1 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 pre-enriquecimiento 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  $6,8 \pm 0,2$  con hidróxido de sodio 1N o ácido clorhídrico 1N estériles. Mezclar y cubrir el recipiente enroscando suavemente la tapa. Incubar  $24 \pm 2$  h a  $35$  °C.

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 pre-enriquecimiento, licuar dos min.

Carnes, sustitutos de carnes, derivados cárnicos, sustancias de origen animal, productos glandulares y harinas (pescado, carne y hueso).

#### **5.4.2 AISLAMIENTO DE SALMONELLA**

Cerrar firmemente el tapón de rosca de los matraces con los cultivos de pre-enriquecimiento y agitar suavemente, transferir respectivamente 1 ml de la mezcla a un tubo que contenga 10 ml de caldo tetrionato y a otro con 10 ml de caldo selenito cistina. Como alternativa, en sustitución del caldo tetrionato puede emplearse el medio Vassiliadis-Rappaport.

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.

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 tetrionato. Incubar las placas 24 ± 2 h a 35°C.

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 enrojado; las bacterias fermentadoras de la lactosa dan colonias amarillas.

Agar entérico Hektoen: colonias verdes o azul – verdes 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.

### **5.4.3 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA**

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  $24 \pm 2$  h a  $35^{\circ}\text{C}$ .

Almacenar en refrigeración de 5 a  $8^{\circ}\text{C}$  las placas con medios selectivos por sí es necesario retomar más colonias.

Observar el crecimiento en los tubos y considerar presuntivamente positivas para Salmonella las colonias que den las siguientes reacciones:

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 sulfhídrico.

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 sulfhídrico en este medio con ennegrecimiento a lo largo de la punción.

Retener todos los cultivos que muestren las reacciones características de Salmonella en los medios TSI y LIA para las pruebas adicionales, indicadas a continuación.

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.

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.

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.

#### **5.4.3.1 Prueba de ureasa**

Prueba de ureasa (convencional). Con un 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 virre púrpura de las reacciones positivas con el color del medio original. Incubar  $24 \pm 2$  h a  $35$  °C.

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  $37 \pm 0,5$ °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).

### **5.4.3.2 Identificación serológica**

#### **5.4.3.2.1 Ensayo de los antígenos somáticos de Salmonella (Antisuero polivalente O)**

Colocar con un 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.

Agregar a una de ellas una gota del antisuero polivalente somático (O) y mezclar con el canto del asa o empleando aplicadores de madera.

Agitar inclinando la lámina hacia atrás y hacia adelante durante aproximadamente un min.

Observar bajo buena iluminación sobre un fondo oscuro.

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.

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).

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.

Si no se cuenta con los sueros grupo específicos, 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.

#### **5.4.3.2.2 Si se requiere, practicar el ensayo de los antígenos flagelares de Salmonella (Antisuero polivalente H)**

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).

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.

#### **5.4.4 PRUEBAS BIOQUÍMICAS COMPLEMENTARIAS**

Cuando las pruebas serológicas o bioquímicas iniciales dan resultados atípicos o no concluyentes, realizar las pruebas que se describen a continuación:

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*.

Interpretar los cambios en los medios inoculados conforme lo siguiente:

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.

Medio SIM

Inocular por punción Incubar 24 h a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  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 sulfhídrico

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.

Caldo RM-VP

Inocular un tubo con el medio

Incubar  $48 \pm 2$  h a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  para la prueba de VP y 96 h para la prueba RM

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  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  o 4 h a temperatura ambiente.

Prueba positiva: desarrollo de color rojo ladrillo.

Prueba negativa: sin cambio de color.

Re incubar el resto del medio RM-VP 48 h más a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$

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.

Caldo malonato

Inocular un tubo conteniendo el medio Incubar  $40 \pm 2$  h a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$

Prueba positiva: desarrollo de color azul.

Prueba negativa: sin cambio de color.

Caldo manitol

Inocular un tubo conteniendo el medio Incubar  $24 \pm 2$  h a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Prueba positiva: desarrollo de color amarillo.

Prueba negativa: sin cambio de color

Consultar los resultados obtenidos en el cuadro 2 para la identificación de los géneros de las bacterias investigadas en la norma NOM-242-SSA1-2009.

Nota: Los sistemas bioquímicos comerciales validados pueden ser usados como alternativa para las pruebas bioquímicas convencionales.

## **5.5 CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS**

Interpretación de reacciones bioquímicas y serológicas de *Salmonella* de acuerdo con lo establecido en los cuadros publicados en la NOM-242-SSA1-2009.

## **5.6 INFORME DE RESULTADOS**

Informar: presencia o ausencia de *Salmonella* en \_\_\_\_\_ g o \_\_\_\_\_ ml de muestra.

## **6. METODO PARA LA DETERMINACION DE *Staphylococcus aureus* EN ALIMENTOS**

### **6.1 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.

### **6.2 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 por emplear en el método objeto de esta norma deben ser grado analítico.

#### **6.2.1 REACTIVOS**

##### **6.2.1.1 Soluciones diluyentes**



### 6.2.1.1.1 Solución reguladora de fosfatos (Solución concentrada)

#### FORMULA

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
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 121°C ±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 121°C ±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.

### 6.2.1.1.2 Agua peptonada

#### FORMULA

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
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 121°C ±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.

## 6.2.1.2 Medios de cultivo

### 6.2.1.2.1 Medio de Baird-Parker

#### FORMULA

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Medio base	95.0 mL
Solución de telurito de potasio	1.0 mL
Emulsión de yena de huevo	5.0 mL

#### Preparación

Cuando el medio base esté a 45°C, 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 5°C.

### 6.2.1.2.2 Medio base de Baird-Parker

#### FORMULA

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
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 121°C ±1 durante 15 min. Enfriar y mantener el medio a 45°C.

#### **6.2.1.2.3 Solución de telurito**

##### **FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
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 5°C.

#### **6.2.1.2.4 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 mercuríco (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.

#### 6.2.1.2.5 Solución salina isotónica

##### FORMULA

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Cloruro de sodio	0.85 g
Agua	100.0 mL

##### Preparación

Disolver el ingrediente en agua y esterilizar a 121°C ±1 durante 15 min.

#### 6.2.1.2.6 Caldo de infusión cerebro-corazón (BHI)

##### FORMULA

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
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 121°C ±1.

#### 6.2.1.2.7 Ácido desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera

##### FORMULA

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
---------------------	-------------------

* Ácido desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera	0.03 g
Agar	1.0 g
Cloruro de calcio anhidro (solución 0.1 M)	0.10 mL
Cloruro de sodio	1.0 g
Azul de toluidina (solución 0.1 M)	0.3 mL
Tris-(hidroximetil-aminometano) (tris solución 0.05 M, pH 9)	100.0 mL

\* Su equivalente

### 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.

#### 6.2.1.2.8 Solución de cloruro de calcio anhidro 0,01 M (PM: 110.99)

##### FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Cloruro de calcio	0.1199 g
Agua	100.0 mL

Disolver 0,1199 g de cloruro de calcio en 100 ml de agua.

#### 6.2.1.2.9 Solución de azul de toluidina 0,1 M

## FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Azul de toluidina	3.05 g
Agua	100.0 mL

Disolver 3,05 g de azul de toluidina en 100 ml de agua.

### 6.2.1.2.10 Solución amortiguadora 0,05 M Tris-(hidroximetil-aminometano) (PM: 121,1)

## FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Tris	6.055 g
Agua	100.0 mL

Disolver 6,055 g de Tris en 100 ml de agua. pH 9

### 6.2.1.3 *Reactivo biológico:*

#### 6.2.1.3.1 Plasma de conejo

Emplear plasma de conejo deshidratado o rehidratado siguiendo las instrucciones del fabricante y agregar ácido etilendiaminotetraacético (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.

## 6.2.2 MATERIALES

Todos los instrumentos que se utilicen para trabajar la muestra deben esterilizarse mediante horno, durante 2 h de 170-175°C o como alternativa en autoclave durante 15 min como mínimo a 121°C ±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.

### **6.3 APARATOS**

Autoclave con termómetro.

Baño de agua con regulador de temperatura de 35 ± 0,5°C.

Baño de agua con regulador de temperatura de 45 ± 0,5°C.

Balanza con capacidad no mayor de 2,500 g y sensibilidad de 0,1 g.

Incubadora a 35 ± 1°C.

### **6.4 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.

## 6.5 PROCEDIMIENTO

Utilizando diferentes pipetas de 1 ml para cada dilución, depositar 0,1 ml sobre la superficie de las placas de agar Baird-Parker.

Distribuir el inóculo sobre la superficie del agar con varillas estériles de vidrio en ángulo recto, utilizando una para cada dilución.

Mantener las placas en su posición hasta que el inóculo sea absorbido por el agar.

Invertir las placas e incubar de 45 a 48 h a 35°C.

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.

Cuando las placas tengan menos de 15 colonias típicas también pueden ser utilizadas y al informe se debe agregar la nota de "valor estimado".

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.

Seleccionar las colonias de acuerdo con el siguiente cuadro para realizar las pruebas de coagulasa y termonucleasa:

<b>Numero de colonias</b>	<b>Numero de colonias sospechosas en placa por probar</b>
Menos de 50	3
51 a 100	5
101 a 150 o más	7



Seleccionar el número de colonias y sembrar cada una en tubos con 0,5 ml de caldo de infusión cerebro-corazón.

Incubar a 35°C durante 24 h.

Inocular en la misma forma cepas conocidas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* como testigos positivo y negativo.

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.

### **6.5.1 PRUEBA DE COAGULASA**

Agregar a los 0,2 ml del cultivo anterior, 0,2 ml de plasma de conejo diluido volumen a volumen con solución salina estéril.

Incubar en baño de agua de 35 a 37°C 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.

### **6.5.2 Prueba de termonucleasa**

Calentar durante 15 min, 0,3 ml de cultivo en caldo de infusión cerebro-corazón en baño de agua hirviendo.

Pasar una gota de cada cultivo por medio de una pipeta Pasteur a un orificio del medio, incluye testigo.

Incubar a 35°C en cámara húmeda de 4 a 24 h.

La aparición de un halo color rosa extendido de por lo menos 1 mm alrededor de la perforación se califica como positiva.

## 6.6 CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

### 6.6.1 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:  $80 \times 4$

$$= \frac{64 \times 1000 \times 10}{5} = 640\,000$$

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:  $14 \times 2$

$$= \frac{9,3 \times 10 \times 10}{3} = 930$$

3

### 6.6.2 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 de este, que en el 95% de los casos es de  $\pm 16\%$  a  $\pm 52\%$ .

## **7. 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.).

### **7.1 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.

## **7.2 EQUIPO, MATERIALES Y REACTIVOS**

No aplica

## **7.3 PROCEDIMIENTOS**

### **7.3.1 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* spp que 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:

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

Para calcular el NMP/100 g multiplicar por 100.

## **7.4 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:  $NMP/g = P/(NT)^{1/2}$

Donde: P es el número de tubos positivos, N es la cantidad total de muestra (g) en todos los tubos negativos y T es la cantidad total de muestra (g) en todos los tubos.

Por ejemplo, considerando que se tuvieran serie de diluciones al doble:

Muestra (g)	No. De Tubos	No. De Tubos positivos
8	5	5
4	5	4
2	5	2
1	5	0
0.5	5	1
0.25	5	0

El número de tubos positivos es:  $P = (5 + 4 + 2 + 1) = 12$ ;  $N = (8 \times 0) + (4 \times 1) + (2 \times 3) + (1 \times 5) + (0,5 \times 4) + (0,25 \times 5) = 18,25$ ; y  $T = 5 (8+4+2+1+0,5+0,25) = 78,75$

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

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

$$\log (NMP/g) \pm 1,08 (\log a)/n)^{1/2}$$

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  $1,14(n)^{1/2}$  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:

$$nH = k / (1/ n_i)$$

k es el número de diluciones. Por ejemplo: Suponiendo que el resultado de 3 diluciones en ni fuera 5-4-4. Por lo tanto,  $nH = 3 / (1/5) + (1/4) + (1/4) \frac{1}{2} = 3/0,70 = 4,3i$

Para el ejemplo anterior el NMP con n = 5 y un límite de confianza aproximado de 95% será el siguiente:  $\log 0,32 (1,08) (\log 2) /5) \frac{1}{2}$

$$-0,495 \ 0,265$$

Entonces el límite inferior es el antilogaritmo  $(-0,76) = 0.17/g$  o 17/100 g y el límite superior es el antilogaritmo  $(-0,23) = 0,59/g$  o 59/100 g. Cuando se compara con las tablas el NMP podría ser 0,31/g con límites de confianza de 0,16/g y 0,57/g. consultar tablas de la Norma, NOM-242-SSA1-2009.

## **8. DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES, COLIFORMES FECALES Y ESCHERICHIA COLI POR LA TÉCNICA DE DILUCIONES EN TUBO MÚLTIPLE**

### **8.1 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).

### **8.2 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.

## 8.2.1 MEDIOS DE CULTIVO

### 8.2.1.1 *Caldo lauril*

#### FORMULA

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
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	1.0 L

#### **Preparación**

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Ajustar el pH a  $6.8 \pm 0.2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ . Distribuir en tubos de ensaye con campanas de Durham. Adicionar 10 ml de medio para cada tubo. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$ . Antes de abrir la autoclave, dejar bajar la temperatura a  $75^{\circ}\text{C}$  para que no queden burbujas en las campanas de Durham.



**8.2.1.2 Preparación de caldo lauril triptosa (consultar tabla del apartado B.17.3.3.2 de la Norma, NOM-242-SSA1-2009)**

**8.2.1.3 Caldo EC (*E. coli.*)**

**FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
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	1.0 L

**Preparación**

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada y calentar ligeramente para que se disuelva por completo. Ajustar el pH a  $6.9 \pm 0.2$  a 25 °C. 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 la autoclave, dejar bajar la temperatura a 75°C para evitar que queden burbujas en las campanas de Durham.

**8.2.1.4 Agar McConkey**

**FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
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	1.0 L

### Preparación

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Calentar hasta ebullición para disolver por completo. Ajustar el pH a  $7.1 \pm 0.2$  a 25 °C. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 50-60°C y vaciar en cajas Petri.

#### 8.2.1.5 *Agar eosina azul de metileno de Levin (EMB-L)*

#### FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Peptona	10.0 g
Lactosa	10.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.0 g
Eosina Y	0.4 g
Azul de metileno	0.065 g
Agua destilada	1.0 L

### Preparación

Disolver la peptona, el fosfato y el agar en un litro de agua. Calentar hasta ebullición para la disolución completa. Ajustar el pH a  $7.1 \pm 0.2$ . 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.

#### **8.2.1.6 Caldo triptona al 1% (triptófano)**

##### **FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Triptona o tripticasa	10.0 g
Agua destilada	1.0 L

##### **Preparación**

Disolver los ingredientes. Ajustar el pH a  $6.9 \pm 0.2$ . 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.

#### **8.2.1.7 Caldo MR-VP**

##### **FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Peptona tamponada	7.0 g
Glucosa	5.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.0 g
Agua destilada	1.0 L

##### **Preparación**

Disolver los ingredientes con calentamiento suave si es necesario. Ajustar el pH a  $6.9 \pm 0.2$ . Distribuir en volúmenes de 10 ml en tubos de ensaye de 16x150 mm. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

### 8.2.1.8 *Caldo citrato de Koser*

#### FORMULA

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
NaNH <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub> -4H <sub>2</sub> O	1.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0.2 g
Citrato de sodio-H <sub>2</sub> O	3.0 g
Agua destilada	1.0 L

#### **Preparación**

Disolver los ingredientes con calentamiento suave si es necesario. Ajustar el pH a  $6.7 \pm 0.2$ . 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.

### 8.2.2 REACTIVOS

#### 8.2.2.1 *Reactivo de Kovacs*

#### FORMULA

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
p-imetilaminobenzaldehído	5.0 g
Alcohol amílico	75.0 mL
HCl concentrado	25.0 mL

#### **Preparación**

Disolver el p-imetilaminobenzaldehído en alcohol amílico normal. Adicionar lentamente el HCl. Almacenar a 4°C.

#### **8.2.2.1.1 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)

#### **8.2.2.2 Solución 1**

##### **FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Alfa-naftol	5.0 g
Alcohol absoluto	100.0 g

#### **8.2.2.3 Solución 2**

##### **FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Hidróxido de potasio	40.0 g
Agua destilada	100.0 mL

#### **8.2.2.3.1 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.

### 8.2.3 REACTIVOS PARA LA COLORACIÓN DE GRAM

#### 8.2.3.1 *Cristal violeta*

##### 8.2.3.1.1 Solución A

#### FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Cristal violeta (colorante 90%)	2.0 g
Etanol 95%	20.0 mL

##### 8.2.3.1.2 Solución B

#### FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Oxalato de amonio	0.8 g
Agua destilada	80.0 mL

#### 8.2.3.2 *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.

### **8.2.3.3 Iodo de Gram**

#### **FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Iodo	1.0 g
Ioduro de potasio (KI)	2.0 g
Agua destilada	300 mL

1. Colocar el KI 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)

#### **FORMULA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Safranina	2.5 g
Etanol al 95%	100.0 mL

Solución de trabajo: Adicionar 10 ml de la solución concentrada a 90 ml de agua destilada.

## **8.2.4 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.

## **8.2.5 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.

## **8.3 PROCEDIMIENTO**

### **8.3.1 ALIMENTOS**

#### **8.3.1.1 Prueba presuntiva**



Preparar la muestra cómo 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 la prueba confirmatoria

### **8.3.1.2 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  $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  durante  $24\pm 2$  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 la prueba presuntiva. Hacer tinción de Gram para observación de la morfología de las colonias.

## **8.4 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

La formación de gas en el tubo de fermentación secundario dentro de las  $48\pm 3$  horas y la demostración de bacilos Gram (-) no esporulados confirma un resultado positivo de la prueba demostrándose la presencia del grupo coliforme.

## **8.5 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, consulte las tablas que se proporcionan en la norma NOM-242-SSA1-2009.

## **9. MÉTODO PARA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA (MESOFILOS) (NOM-092-SSA1-1994)**

### **9.1 INTRODUCCIÓN**

Contenido de microorganismos viables en un alimento por la técnica de cuenta en placa. La técnica refleja el manejo sanitario del producto ha sido el adecuado.

Estimación de microorganismos viables en una amplia variedad de alimentos.

### **9.2 OBJETIVO**

Método para estimar la cantidad de microorganismos viables presentes en un alimento, agua potable y agua purificada, por la cuenta de colonias en un medio sólido, incubado aeróbicamente.

El fundamento de la técnica consiste en contar las colonias, que se desarrollan en el medio de elección después de un cierto tiempo y temperatura de incubación, presuponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo de la muestra bajo estudio.

### **9.3 REACTIVOS Y MATERIAL**

#### **9.3.1 MEDIO DE CULTIVO**

##### **9.3.1.1 *Agar Triptona-Extracto de Levadura (agar para cuenta estándar)***

#### **FORMULA**

**Ingredientes**

**Cantidades**

Extracto de levadura	2.5 g
Triptona	5.0 g
Dextrosa	1.0 g
Agar	15.0
Agua	1.0 L

### **Preparación del medio de cultivo.**

Suspender los componentes del medio deshidratado en un litro de agua. Hervir hasta total disolución.

Distribuir en recipientes de vidrio esterilizables de capacidad no mayor de 500 ml, cantidades de aproximadamente la mitad del volumen de este. Esterilizar en autoclave a  $121 \pm 1,0$  °C, durante 15 minutos. El pH final del medio debe ser  $7,0 \pm 0,2$  a 25°C. Enfriar y mantener a  $45^\circ\text{C} \pm 1,0$  °C en baño de agua (preferente en estufa a 45°C) hasta antes de su uso. El medio no debe de fundirse más de una vez. El medio de cultivo anterior es el de uso más generalizado.

### **9.3.2 MATERIALES**

Incubadora con termostato ( $\pm 1,0^\circ\text{C}$ )

Contador de colonias de campo obscuro

Registrador mecánico o electrónico.

Microscopio óptico.

Baño de agua ( $1,0$  °C).

Utensilios esterilizados, cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas (principalmente de estos dos últimos)

Cajas de petri de vidrio esterilizar

Tubos de ensayo esterilizar

### 9.3.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

#### 9.3.3.1 *Solución (diluyente)*

##### 9.3.3.1.1 Agua peptonada

#### FORMULA

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidades</b>
Peptona	1.0 g
NaCl	8.5 g
Agua	1.0 L

Disolver los ingredientes con calentamiento suave si es necesario. Ajustar el pH a 7.0. Esterilizar en autoclave a 121°C/15min. Almacenar a 0-5°C en lugar oscuro

Distribución en porciones

90ml para dilución primaria (en frascos con tapa de 250 o de 500 ml)

10 ml para dilución decimal (en tubos de ensayo)

#### 9.3.3.2 *Procedimiento*

##### 9.3.3.2.1 Preparación de la dilución primaria (Muestras solidas)

Pesar una cantidad de 10g de la muestra en una bolsa plástica estériles

Adicionar a 90 ml del diluyente (agua peptonada)

Homogenizar en licuadora (agitando fuertemente de arriba hacia abajo) de 1 a 2 minutos.

Permitir que sedimente

Transferir de la capa superior la cantidad adecuada a una placa de Petri para su siembra (1ml)

#### **9.3.3.2.2 Diluciones decimales**

De la dilución primaria preparar las diluciones decimales

Transferir 1ml de la capa superior de la dilución primaria a un tubo de ensayo que contenga 9 ml de agua peptona, mezclar hasta homogenizar.

Realizar 6 diluciones seriadas.

Esto es, a partir de la primera dilución decimal en el tubo de ensayo, tomar un mililitro de la dilución -2 y pasar a la dilución -3, mezclar hasta homogenizar la solución y repetir los pasos previos hasta c llegar a la dilución -7(6 tubos de ensayo).

Las muestras ya estarán listas para sembrar. (Ver la imagen ilustrativa).

Se siembra desde la muestra frasco hasta la muestra tubo de ensayo 7. Realizar la siembra por duplicado.

### **9.4 PROCEDIMIENTO**

Realizar la siembra en el Agar Triptona-Extracto de Levadura

Distribuir las cajas de Petri (estériles) en la mesa de trabajo. (marcar las cajas previamente con el tipo de muestra y numero de dilución)

Realizar la inoculación de la muestra por el método de mezcla. De las diluciones de las muestras preparadas a cada una de las cajas de Petri por duplicado, realizar el procedimiento como sigue:

Trasferir 1 ml de la muestra a la caja de Petri estéril (inoculación) por duplicado

Agregar de 10-15 ml del medio preparado (Agar Triptona-Extracto de Levadura)

Mezclar mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 al sentido contrario y 6 de arriba hacia abajo hasta lograr una

completa incorporación del inoculo en el medio, homogenizando el medio con el inoculo.

Incluir una caja sin inoculo como blanco y otra con diluyente como control diluyente.

Incubar a 35°C por 48±2 h.

En la lectura seleccionar aquellas placas donde aparezcan entre 25 a 250 UFC, para disminuir el error en la cuenta.

Contar todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas (excepto las de mohos y levaduras), incluyendo las colonias puntiformes. Hacer uso del microscopio para resolver los casos en los que no se pueden distinguir las colonias de las pequeñas partículas de alimento.

## **9.5 EXPRESIÓN DE RESULTADOS**

### **9.5.1 CÁLCULO DEL MÉTODO**

Después de la incubación, contar las placas que se encuentren en el intervalo de 25 a 250 colonias, usando el contador de colonias y el registrador. Las placas de al menos una de tres diluciones deben estar en el intervalo de 25 a 250. Cuando sólo una dilución está en el intervalo apropiado, consulte el cuadro 2, ejemplo 1 de la norma NOM-092-SSA1-1994. Calcular la cuenta promedio por gramo o mililitro de dicha dilución y reportar.

Cuando dos diluciones están en el intervalo apropiado, determinar la cuenta promedio dada por cada dilución antes de promediar la cuenta de las dos diluciones para obtener la cuenta en placa por gramo o mililitro, consulte el cuadro 2, ejemplo 2 de la norma NOM-092-SSA1-1994.

Con el fin de uniformar los criterios para el reporte de las cuentas en ensayos donde las placas presenten situaciones no contempladas en los ejemplos anteriores, se presentan las siguientes guías:

Placas con menos de 25 colonias. - Cuando las placas corridas para la menor dilución muestran cuentas de menos de 25 colonias, contar el número de colonias presentes en dicha dilución, promediar el número de colonias y multiplicar por el factor de dilución para obtener el valor estimado de cuenta en placa. Aclarar en su informe esta situación agregando la leyenda "valor estimado", consulte el cuadro 2, ejemplo 3 de la norma NOM-092-SSA1-1994.

Placas con más de 250 colonias. - Cuando el número de colonias por placa exceda de 250, contar las colonias en aquellas porciones de la placa que sean representativas de la distribución de colonias. Contar, por ejemplo, una cuarta parte o una mitad del área de la caja y multiplicar el valor obtenido por 4 ó 2, respectivamente. Si solamente pueden contarse algunos cuadros, considerar que el fondo de una caja Petri de 100 mm de diámetro contiene 65 cuadros de la cuadrícula del contador.

Aclarar en el informe esta situación agregando la leyenda "valor estimado", consulte el cuadro 2, ejemplo 4 de la norma NOM-092-SSA1-1994.

Colonias extendidas. - Las colonias extendidas pueden presentarse en las siguientes formas:

Cadenas de colonias no separadas claramente entre sí, que parecen ser causadas por la desintegración de un cúmulo de bacterias.

Colonias que se desarrollan en película entre el agar y el fondo de la caja.

Colonias que se desarrollan en película en la orilla de la caja sobre la superficie del agar.

Colonias de crecimiento extendido y en algunas ocasiones acompañadas de inhibición del crecimiento, que en conjunto exceden el 50% de la caja o represión del crecimiento que por sí mismo excede el 25% de la superficie de la caja.

Cuando es necesario contar en cajas que contienen colonias extendidas que no estén incluidas en lo previamente establecido consultar la de la norma NOM-092-SSA1-1994 en los apartados 10.1.3.3.1, 10.1.3.3.2 ó 10.1.3.3.3, como provenientes

de una sola fuente. En el caso de las colonias del tipo 10.1.3.3.1, si la caja contiene una sola cadena, contar como una sola colonia, si la caja contiene varias cadenas que parecen originarse de fuentes separadas, contar cada cadena como colonia individual. No contar cada colonia de la cadena individualmente. Las colonias del tipo 10.1.3.3.2 y 10.1.3.3.3 generalmente se observan como crecimiento diferenciable de otras colonias y se cuentan como tales.

Los crecimientos tipo 10.1.3.3.4, establecidos en la norma NOM-092-SSA1-1994 (consultar norma) reportarlos como crecimiento extendido. En caso de que una dilución se encuentre dentro del rango y otra dilución presente colonias de crecimiento extendido, reportar la dilución en la que se pueden contar las colonias, consultar el cuadro 2, ejemplo 5 de la norma NOM-092-SSA1-1994.

Placas sin colonias. - Cuando las placas de todas las diluciones no muestran colonias, reportar la cuenta en placa como menor que una vez el valor de la dilución más baja usada, consultar el cuadro 2, ejemplo 6 de la norma NOM-092-SSA1-1994.

Placas corridas por duplicado, una con crecimiento dentro del intervalo adecuado y otra con más de 250 colonias. - Cuando una placa tiene entre 25 y 250 colonias y su duplicado más de 250 colonias, contar ambas placas incluyendo la que está fuera del intervalo para determinar la cuenta en placa, consulte el cuadro 2, ejemplo 7 de la norma NOM-092-SSA1-1994.

Placas corridas por duplicado, una placa de cada dilución dentro del intervalo de 25 a 250 colonias. - Cuando una placa dentro de diferentes diluciones contiene el número de colonias especificadas en el intervalo, contar el número de colonias de las cuatro placas para calcular la cuenta en placa, consultar el cuadro 2, ejemplo 8 de la norma NOM-092-SSA1-1994.

Placas corridas por duplicado, ambas placas de una dilución dentro del intervalo de 25 a 250 y sólo una de la otra dilución dentro del mismo. Contar las cuatro cajas incluyendo aquélla con menos de 25 o más de 250 colonias, para calcular la cuenta en placa, consultar el cuadro 2, ejemplo 9 de la norma NOM-092-SSA1-1994.



Después de contabilizar las colonias en las placas seleccionadas, multiplicar por la inversa de la dilución para obtener el número de UFC por mililitro o gramo de la muestra. Redondear la cifra obtenida en la cuenta de manera que sólo aparezcan dos dígitos significativos al inicio de esta cifra. Para redondear, elevar el segundo dígito al número inmediato superior cuando el tercer dígito de la derecha sea cinco o mayor (por ejemplo: 128 redondear a 130). Si el tercer dígito es cuatro o menos, reemplazar el tercer dígito con cero y el segundo dígito mantenerlo igual (Por ejemplo: 2417 a 2400):

## **9.6 INFORME DE LA PRUEBA**

Reportar como: Unidades formadoras de colonias, \_\_\_ UFC/g o ml, de bacterias aerobias en placa en agar triptona extracto de levadura o agar para cuenta estándar, incubadas \_\_\_\_\_ horas a \_\_\_\_\_ °C.

## 10. ANEXOS



Figura 1. Equipos de laboratorio de microbiología. A) Campana de flujo. B) Incubadoras

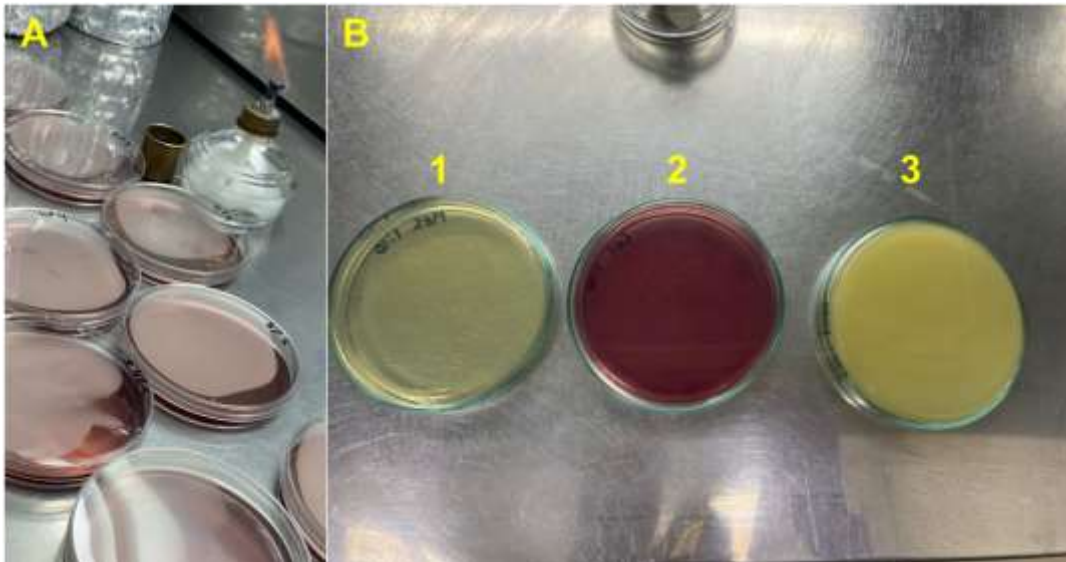


Figura 2. A) Preparación de medio de cultivo. B) Medios de cultivo. 1, Medio de cultivo mesófilos; 2, Medio de cultivo coliformes; 3. Medio de cultivo *Staphylococcus aureus*.

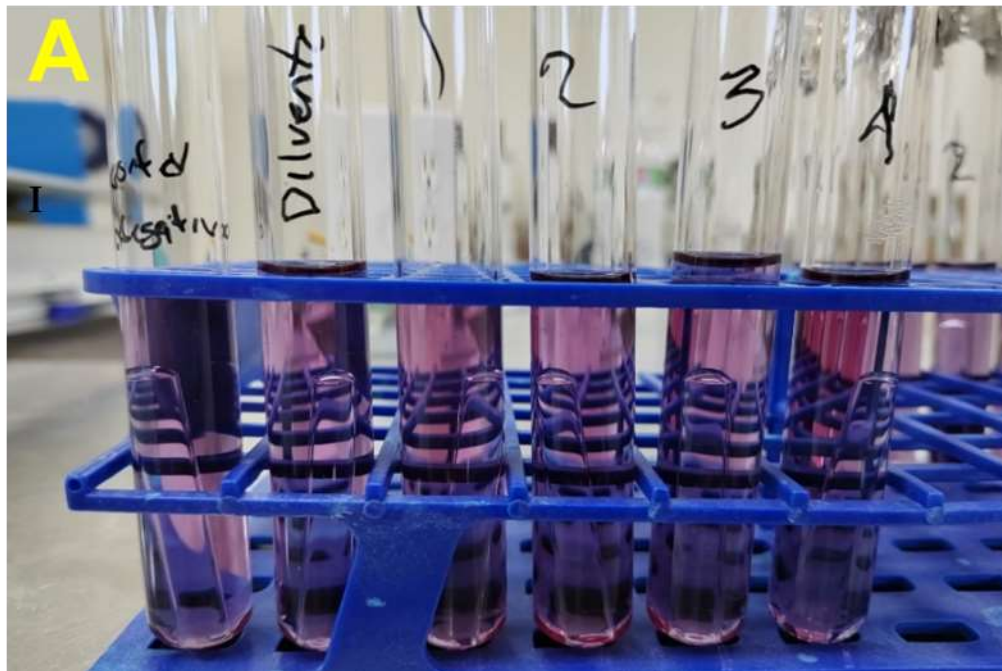


Figura 3. A) Preparación de medio para análisis por la técnica de numero mas probable.

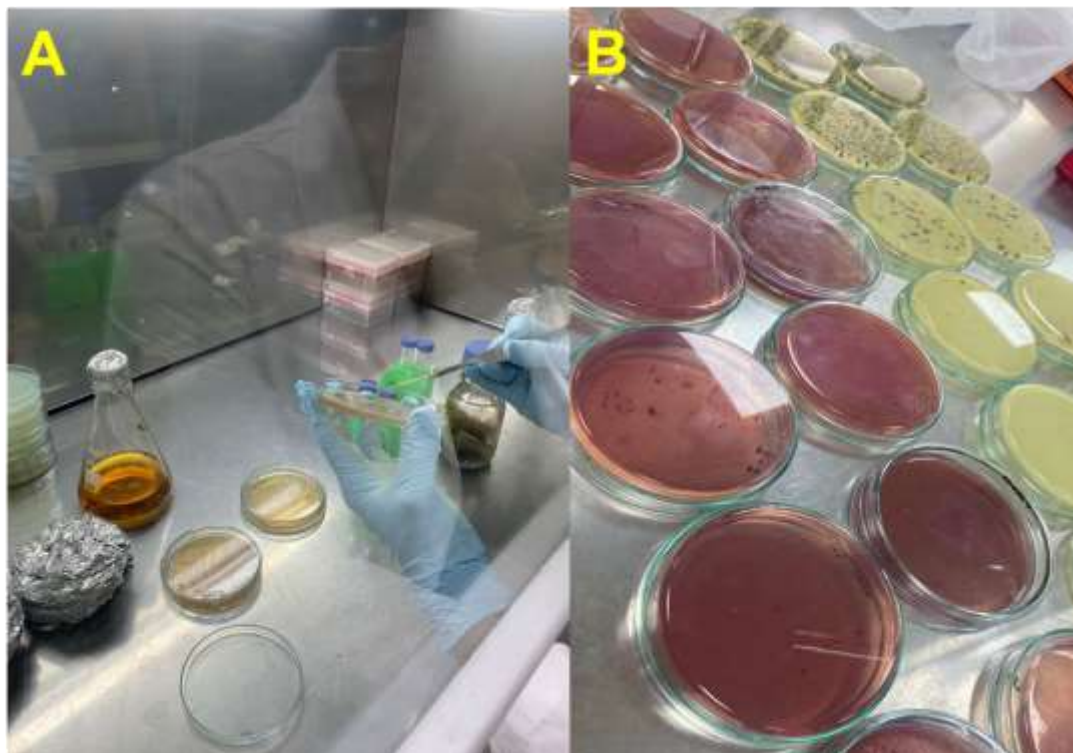


Figura 4. Proceso de análisis de muestras. A) Siembra de muestras en medio de cultivo. B) Análisis de resultados evaluación de muestras positivas y conteo de colonias.



*Figura 5. Incubación de muestras sembradas. A) Incubadora. B) Medios de cultivos con muestras en etapa de incubación.*

## **11. REFERENCIAS**

1. Secretaria de Salud (SSA). (1994). NOM-092-SSA1-1994: Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Ciudad de México. SSA
2. Secretaria de Salud (SSA). (2009). NOM-242-SSA1-2009: Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. Ciudad de México. SSA.