

SECRETARIA DE SALUD

PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-210-SSA1-2002, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos y toxinas microbianas.

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

PROYECTO DE NORMA OFICIAL MEXICANA PROY-NOM-210-SSA1-2002, PRODUCTOS Y SERVICIOS. METODOS DE PRUEBA MICROBIOLÓGICOS. DETERMINACION DE MICROORGANISMOS INDICADORES. DETERMINACION DE MICROORGANISMOS PATOGENOS Y TOXINAS MICROBIANAS.

ERNESTO ENRIQUEZ RUBIO, Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 3 fracciones XXII y XXIV, 13 apartado A) fracciones I y II, 194 fracción I, 195, 197, 199 y 214 de la Ley General de Salud; 38 fracción II, 40 fracciones I, III, VII, XI y XIII, 41 y 47 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 4, 15 y Quinto Transitorio del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios; 28 y 33 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 2, literal C, fracción II, 34 y 36 fracción V, del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud, y 2 fracciones II y III, 7 fracción XVI y 11 fracciones I y II del Decreto por el que se crea la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, me permito ordenar la publicación en el **Diario Oficial de la Federación** del Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-210-SSA1-2002, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos y toxinas microbianas.

El presente proyecto se publica a efecto de que los interesados, dentro de los siguientes 60 días naturales, contados a partir de la fecha de su publicación, presenten sus comentarios en idioma español y con el sustento técnico suficiente ante el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, sito en Monterrey número 33, colonia Roma, código postal 06700, México, D.F., correo electrónico rfs@salud.gob.mx.

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

PREFACIO

En la elaboración de la presente norma participaron los siguientes Organismos e Instituciones.

SECRETARIA DE SALUD.

Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.

Dirección General de Control Sanitario de Productos y Servicios.

Laboratorio Nacional de Salud Pública.

Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica.

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.

SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACION.

Dirección General de Sanidad Vegetal.

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.

PROCURADURIA FEDERAL DEL CONSUMIDOR.

Dirección General de Investigación.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

Facultad de Química.

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL.

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

AMERICAN QUALITY LAB, S.A. DE C.V.

BUFETE QUIMICO, S.A. DE C.V.

CENTRO DE CONTROL TOTAL DE CALIDADES S.A. DE C.V.

LICONSA, S.A. DE C.V.

SOCIEDAD MEXICANA DE NORMALIZACION Y CERTIFICACION, S.C. NORMEX.

INDICE

1. Objetivo y campo de aplicación
2. Referencias
3. Definiciones
4. Símbolos y abreviaturas
5. Microorganismos indicadores
6. Microorganismos patógenos y toxinas microbianas
7. Concordancia con normas internacionales
8. Bibliografía
9. Observancia de la norma

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana tiene por objetivo establecer los métodos generales de prueba para la determinación de bacterias aerobias, bacterias coliformes, *Escherichia coli*, mohos y levaduras, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae O:1*, y sus toxinas y enterotoxina estafilocócica en alimentos.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el Territorio Nacional para las personas físicas o morales que se dedican a efectuar los métodos al que se refiere el numeral anterior en alimentos nacionales o de importación, para fines oficiales.

2. Referencias

- 2.1 NOM-008-SCFI-1993, Sistema General de Unidades de Medida
- 2.2 NOM-180-SSA1-1998, Agua para uso y consumo humano. Equipos de tratamiento de tipo doméstico. Requisitos sanitarios.

3. Definiciones

Para fines de esta norma se entiende por:

3.1 ***Clostridium botulinum***, al bacilo Gram positivo, móvil, mesófilo anaerobio obligado, catalasa negativo, que llega a exhibir filamentos largos nunca ramificados. Forma una espora subterminal y oval que deforma el cuerpo bacteriano. Libera una toxina muy potente que produce la enfermedad del botulismo.

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

3.3 **Colonias**, al agrupamiento de células en forma de masas visibles, sobre el agar de cultivo.

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

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

3.6 **β -Hemólisis**, a la zona transparente alrededor de la colonia debida a la lisis total del eritrocito.

3.7 **Levaduras**, a los microorganismos cuya forma dominante de crecimiento es unicelular. Poseen un núcleo y se multiplican por reproducción sexual o asexual, por gemación o por fisión transversal. La reproducción sexual cuando ocurre, es por medio de ascosporas contenidas en un saco o asca.

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

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

3.10 **Mohos**, al grupo de hongos microscópicos; organismos pertenecientes al reino *Fungi*, que se caracterizan por estar formados de una estructura filamentosa con ramificaciones que se conocen con el

nombre de hifas, el conjunto de hifas constituye el micelio, carecen de clorofila, se alimentan por absorción pudiendo propagarse por esporas o no, las paredes celulares pueden ser de queratina, celulosa o manana. Crecen formando colonias en un medio selectivo a 25-28°C.

3.11 Patógeno, al microorganismo capaz de producir una enfermedad.

3.12 Psicofílico, al microorganismo que exhibe una temperatura óptima de crecimiento a 5-7°C como máximo. Tiene la capacidad de crecer a 0°C.

3.13 Psicotrófico, al microorganismo que exhibe una temperatura óptima de crecimiento a 20°C, pero que puede desarrollarse a temperaturas de refrigeración.

3.14 *Salmonella*, al bacilo Gram negativo, aerobio o anaerobio facultativo, no esporulado, lactosa negativo.

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

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

3.17 Toxina, a la sustancia productora de efectos tóxicos secretada por las bacterias patógenas.

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

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

4. Símbolos y abreviaturas

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

ATCC	American Type Culture Collection
β	Beta
cm	Centímetro
CIP	Culture International Production
spp	especies plurales
°C	grados Celsius
g	Gramos
h	Hora
1/d	inverso de la dilución
L	Litro
±	más menos
≥	mayor igual
<	Menor
µm	Micrómetro
mL	Mililitro
mm	milímetro
min	minuto
M	molar
nm	nanómetro
NCTC	National Culture Type Collection
N	normal
No.	número
NMP	número más probable
p	peso
/	por
%	por ciento
pH	potencial de hidrógeno

rpm	revoluciones por minuto
seg	segundo
x	signo de multiplicación
UFC	unidades formadoras de colonias
V	volumen

5. Microorganismos indicadores

5.1 Preparación y dilución de muestras.

5.1.1 Principio del método

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.

5.1.2 Equipo

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

5.1.2.2 Autoclave verificada con termómetro de máximas y manómetro calibrado.

5.1.2.3 Baño de agua a una temperatura de $45 \pm 2^\circ\text{C}$.

5.1.2.4 Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato o bien un homogeneizador peristáltico (stomacher).

5.1.2.5. Balanza con sensibilidad de 0,1 g.

5.1.2.6. Refrigerador con temperatura de $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

5.1.3. Materiales

5.1.3.1 Pipetas bacteriológicas o graduadas de 1 y 10 mL (o si es necesario de 1 y 2 mL), con tapón de algodón y con divisiones de 0,1 mL.

5.1.3.2 Frascos de vidrio de 125 a 250 mL con tapón de rosca.

5.1.3.3 Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca.

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

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

5.1.3.6 Mecheros Bunsen o Fisher

5.1.3.7 Propipetas

5.1.3.8 Pipeta electrónica programable (opcional)

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

a) Horno, durante 2 h a 170 a 175°C o 1 h a 180 a 185°C o

b) Autoclave, durante 15 minutos como mínimo a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

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

5.1.4 Reactivos

Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y para efectos de este método por agua se entiende agua destilada.

5.1.4.1 Solución de hidróxido de sodio 1,0 N

Disolver 4 g de hidróxido de sodio y llevar a 100 mL con agua.

5.1.4.2 Soluciones diluyentes

5.1.4.2.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada).

Disolver 34 g de fosfato monopotásico en 500 mL de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1 N. Llevar con agua a 1 L.

Conservar en refrigeración.

5.1.4.2.2 Solución reguladora de fosfatos (solución de trabajo).

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 a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 minutos.

Después de la esterilización, el pH debe ser de $7 \pm 0,2$ y el volumen final de la solución de trabajo debe corresponder al volumen requerido.

5.1.4.2.3 Agua peptonada

Ingredientes	Cantidades
Peptona	1 g
Cloruro de sodio(NaCl)	8,5 g
Agua	1 L

Preparación:

Disolver los componentes en un litro de agua. Ajustar el pH a $7 \pm 0,1$ 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 a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 minutos.

Después de la esterilización, el pH debe ser de $7 \pm 0,2^\circ\text{C}$ y el volumen final de la solución de trabajo debe corresponder al volumen requerido.

Todos los diluyentes que no sean usados inmediatamente, se almacenan en un lugar oscuro a temperatura de refrigeración por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición.

5.1.5 Preparación de la muestra.

5.1.5.1 Para muestras líquidas no viscosas (leche, bebidas no alcohólicas, etc.) en las cuales la distribución de microorganismos es homogénea o fácilmente homogeneizable, agitar invirtiendo el contenedor unas 25 veces.

5.1.5.2 Para muestras congeladas de un alimento originalmente líquido o licuable, fundir por completo en baño de agua a $40-45^\circ\text{C}$ por un tiempo máximo de 15 minutos y homogeneizar agitando vigorosamente como se describe en el numeral 5.1.5.1.

5.1.5.3 Las muestras congeladas, deben descongelarse en refrigeración durante 18 horas y no más de 24 horas antes de proceder a su análisis.

5.1.6 Preparación de la dilución primaria (10^{-1} o 1:10)

5.1.6.1 A partir de muestras líquidas.

Tomar 10 u 11 mL de la muestra y diluir con 90 o 99 mL del diluyente el cual debe encontrarse a una temperatura similar a ésta, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente. Agitar con movimientos hacia arriba y abajo unas 25 veces en un arco de 30 cm durante 7 segundos.

5.1.6.2 A partir de muestras sólidas o semisólidas (líquidos viscosos).

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

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

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

5.1.6.2.4 Permitir que las partículas grandes se sedimenten y transferir la cantidad deseada tomando de las capas superiores de la suspensión formada.

5.1.6.2.5 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 puede no ser adecuado para algunos productos (por ejemplo, aquellos con partículas agudas o constituyentes que no se dispersen fácilmente). Se utiliza sólo cuando existe evidencia (publicada o por ensayos comparativos) de que los resultados obtenidos no difieren significativamente con aquellos obtenidos con licuadora.

5.1.7 Preparación de las diluciones decimales adicionales.

5.1.7.1 Transferir 1 mL o un múltiplo, por ejemplo, 10 u 11 mL de la dilución primaria en otro recipiente, conteniendo nueve veces el volumen del diluyente estéril a la temperatura apropiada, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente.

5.1.7.2 Mezclar cuidadosamente cada botella de diluyente siempre de la misma manera, como se describe en el numeral 5.1.5.1.

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

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

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

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

5.1.7.7 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.

5.1.7.8 El criterio para seleccionar las diluciones a preparar de acuerdo con el número de microorganismos esperados, depende de la naturaleza de la muestra.

5.1.7.9 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.

5.2 Cuenta de bacterias aerobias en placa.

5.2.1 Principio del método.

Indica el número de UFC de bacterias aerobias en un producto, las cuales se desarrollan en el medio de cultivo agar cuenta estándar después de un cierto tiempo y temperatura de incubación.

5.2.2. Equipo

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

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

5.2.2.3 Microscopio óptico.

5.2.2.4 Registrador mecánico o electrónico.

5.2.2.5 Campana de flujo laminar (opcional).

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

5.2.2.7 Autoclave verificada con termómetro de máximas y manómetro calibrado.

5.2.2.8 Baño de agua a una temperatura de $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

5.2.3 Materiales

5.2.3.1 Cajas de Petri.

5.2.3.2 Contenedores para pipetas y cajas de Petri.

5.2.3.3 Termómetro con divisiones de $0,1^{\circ}\text{C}$, calibrado o verificado.

5.2.3.4 Pipetas bacteriológicas o graduadas de 1 y 10 mL (o si es necesario de 1 y 2 mL), con tapón de algodón y con divisiones de 0,1 mL.

5.2.3.5 Mecheros Bunsen o Fisher

5.2.3.6 Propipetas

5.2.3.7 Pipeta electrónica programable (opcional)

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

- a) Horno, durante 2 h a 170 a 175°C o 1 h a 180 a 185°C o
- b) Autoclave, durante 15 minutos como mínimo a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

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

5.2.4 Medios de cultivo.

En el caso de utilizar medio de cultivo deshidratado, seguir las instrucciones del fabricante.

Agar cuenta estándar (ACE).

Ingredientes	Cantidades
Extracto de levadura	2,5 g
Triptona	5 g
Dextrosa	1 g
Agar	15 g
Agua	1 L

pH final $7 \pm 0,2$

Preparación:

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 del mismo. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 15 minutos.

Si el medio de cultivo es utilizado inmediatamente, enfriar a $45^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ en baño de agua y mantenerlo a esta temperatura hasta antes de su uso. El medio no debe fundirse más de una vez.

El medio de cultivo anterior es el de uso más generalizado para la determinación de bacterias aerobias. Para algunos alimentos en particular se requiere de un medio de cultivo especial el cual se debe indicar al describir la técnica para ese alimento.

5.2.5 Determinación.

5.2.5.1 Distribuir las cajas de Petri en la mesa de trabajo, de manera que la inoculación de las diluciones de las muestras preparadas, la adición del medio de cultivo y su homogeneización, se puedan realizar cómoda y libremente. Marcar las cajas en sus tapas con los datos pertinentes, previamente a su inoculación y correr por duplicado.

5.2.5.2 Colocar en cajas de Petri por duplicado 1 mL de la muestra líquida directa o de la dilución primaria de conformidad con el numeral 5.1.6, utilizando para tal propósito una pipeta estéril.

5.2.5.3 Repetir el procedimiento conforme a lo establecido en el numeral 5.1.7, tantas veces como diluciones decimales se requiera sembrar, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución.

5.2.5.4 Después de la inoculación en las cajas de Petri, adicionar la cantidad apropiada de agar cuenta estándar preparado y enfriado previamente a $45^\circ\pm 1^\circ\text{C}$, mezclarlo mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el medio no moje la cubierta de las cajas. Dejar solidificar.

5.2.5.5 Incluir por lote y diluyente preparado, una caja con medio de cultivo sin inocular como muestra testigo de esterilidad.

5.2.5.6 El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente y hasta que se adiciona el medio de cultivo a las cajas, no debe exceder de 15-20 minutos.

5.2.5.7 Una vez solidificado el medio de cultivo, incubar las cajas en posición invertida (la tapa hacia abajo) por el tiempo y la temperatura que se requieran, según el tipo de alimento y microorganismo de que se trate, de acuerdo con el cuadro 1.

Cuadro 1

Grupo bacteriano	Temperatura	Tiempo de incubación
Termofílicos aerobios	55 ± 2°C	48 ± 2 h
Mesofílicos aerobios*	35 ± 2°C	48 ± 2 h
Psicrotróficos	20 ± 2°C	3-5 días
Psicrofílicos	5 ± 2°C	7-10 días

* En el análisis de agua para consumo humano se debe incubar a 35 ± 2°C durante 48 h.

5.2.5.8 Para llevar a cabo la lectura seleccionar aquellas placas donde aparezcan entre 25 a 250 UFC, con el fin de disminuir el error en el recuento. Las placas de al menos una de tres diluciones deben estar en dicho intervalo.

5.2.5.9 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.

5.2.5.10 Las colonias extendidas pueden presentarse en las siguientes formas:

- a) En cadenas de colonias no separadas claramente entre sí, que parecen ser causadas por la desintegración de un cúmulo de bacterias.
- b) En colonias que se desarrollan en película entre el agar y el fondo de la caja.
- c) En colonias que se desarrollan en película en la orilla de la caja sobre la superficie del agar.

5.2.5.11 Contar cualquiera de los tipos establecidos en el numeral 5.2.5.10 a), b) o c) como provenientes de una sola fuente. En el caso de las colonias descritas en el numeral 5.2.5.10 a), si la caja contiene una sola cadena, contar como una sola colonia. En cambio, si la caja contiene varias cadenas que parecen originarse de fuentes separadas, contar cada cadena como colonia individual. Las colonias establecidas en el numeral 5.1.5.10 a) y b) generalmente se observan como crecimiento diferenciable de otras colonias y se cuentan como tales.

5.2.6 Expresión de resultados

5.2.6.1 Cálculos.

- Ejemplo 1 Cuando sólo una dilución está en el intervalo apropiado, calcular la cuenta promedio por gramo o mililitro de dicha dilución y reportar.
- Ejemplo 2 Cuando dos diluciones están en el intervalo apropiado, determinar la cuenta promedio dada por cada dilución antes de promediar la cuenta de ambas diluciones para obtener la cuenta en placa por gramo o mililitro.
- Ejemplo 3 Cuando las placas corridas para la menor dilución muestran menos de 25 UFC, 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 el informe esta situación agregando la leyenda "valor estimado".
- Ejemplo 4 Cuando el número de colonias por placa exceda de 250 UFC para todas las diluciones, 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 o 2 respectivamente. Si solamente pueden contarse algunos cuadros, considerar el diámetro de la caja de Petri, y calcular el número de cuadros por área. Aclarar en el informe esta situación agregando la leyenda "valor estimado".
- Ejemplo 5 En caso de que una dilución se encuentre dentro del intervalo y otra dilución presente colonias de crecimiento extendido, reportar la dilución en la que se pueden contar las colonias.
- Ejemplo 6 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.
- Ejemplo 7 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.

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 del producto. 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).

**Cálculo de los valores de la cuenta en placa
(Ensayos por duplicado)**

Ejemplo número	Colonias contadas			UFC/g o mL
	1:100	1:1000	1:10000	
1	> 250 ^a	178	16	180 000
	> 250	190	17	
2	> 250	220	25	250 000
		238	28	
3	18	2	0	1 600 ^b
	14	0	0	
4	> 250	> 250	512	5 000 000 ^b
	> 250	> 250	495	
5	> 250	240	34	240 000
	> 250	235	Crecimiento Extendido	
6	0	0	0	< 100 ^c
7	> 250	240	24	250 000
	> 250	268	19	

^a Cuenta por arriba de 250 colonias.

^b Debe aclararse "valor estimado" por encontrarse los valores fuera del intervalo de 25 a 250.

^c Debe informarse de acuerdo a la menor dilución ensayada y contada, en este caso 1:100.

5.2.7 Informe de la prueba

UFC de termofílicos, mesofílicos, psicrotróficos o psicrofílicos/g, mL o superficie

5.3. Cuenta de bacterias coliformes totales y *escherichia coli* en placa.

5.3.1 Principio del método

Determina el número de UFC de coliformes presentes en un producto, utilizando un medio selectivo (agar bilis rojo violeta) en el que se desarrollan bacterias a 32-35°C en un tiempo de 24 h, dando como resultado la producción de gas y ácidos por la fermentación de la lactosa.

5.3.2. Equipo.

Como se describe en el numeral 5.2.2

5.3.3 Materiales.

Conforme a lo establecido en el numeral 5.2.3

5.3.4 Medios de cultivo.

En el caso de utilizar medio de cultivo deshidratado, seguir las instrucciones del fabricante.

5.3.4.1 Agar bilis rojo violeta (RVBA)

Ingredientes	Cantidades
Peptona	7 g

Extracto de levadura	3 g
Lactosa	10 g
Sales biliares	1,5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,002 g
Agar	15 g
Agua	1 L

Preparación:

Mezclar los componentes en el agua y dejar reposar durante algunos minutos.

Mezclar perfectamente y ajustar el pH a 7,4 con ácido clorhídrico 0,1N o con hidróxido de sodio 0,1N a 25°C, de forma que después del calentamiento se mantenga en este valor.

Calentar con agitación constante y hervir durante 2 minutos. Enfriar inmediatamente el medio en un baño de agua hasta que llegue a 45°C. Evitar el sobrecalentamiento del medio.

No debe esterilizarse en autoclave.

Usar el medio dentro de las tres primeras horas después de su preparación.

5.3.4.2 Caldo lactosa bilis verde brillante.

Ingredientes	Cantidades
Peptona	10 g
Lactosa	10 g
Sales biliares	20 g
Verde brillante	0,0133 g
Agua destilada	1 L

pH final: 7,2

Preparación:

Disolver los componentes o el medio completo deshidratado en agua. Calentar si es necesario.

Ajustar el pH. Distribuir el medio en cantidades de 10 mL en tubos de 16 x 160 mm conteniendo campanas de fermentación. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

Las campanas de fermentación no deben contener burbujas de aire después de la esterilización.

5.3.5 Prueba presuntiva.

5.3.5.1 Proceder como se describe en los numerales 5.2.5.1 a 5.2.5.6 pero utilizando agar bilis rojo violeta conforme a lo establecido en el numeral 5.3.4.1.

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

5.3.5.3 Invertir las placas e incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 24 ± 2 horas.

5.3.5.4 Después del periodo especificado para la incubación, contar las UFC con el contador de colonias.

5.3.5.5 Seleccionar las placas que contengan entre 25 y 250 UFC. Las colonias típicas son de color rojo oscuro, generalmente rodeadas de un halo de color rojo claro o rosa, debido a la precipitación de las sales biliares. La morfología colonial es semejante a lentes biconvexas con un diámetro de 0,5 a 2,0 mm.

5.3.6 Prueba confirmatoria.

5.3.6.1 Seleccionar colonias típicas de coliformes y transferir a tubos conteniendo caldo lactosa bilis verde brillante conforme a lo establecido en el numeral 5.3.4.2. Incubar los tubos a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Examinar a las 24 y 48 horas y observar la producción de gas. La formación de gas en el tubo de fermentación dentro de las 24-48 horas confirma un resultado positivo a coliformes totales.

5.3.6.2 Determinar el número de coliformes totales por gramo multiplicando el porcentaje de tubos confirmados como positivos por la cuenta original en agar RVBA, por ejemplo número de UFC de coliformes multiplicado por el factor de dilución.

5.3.7 Determinación de *E. coli*

Para encontrar *E.coli* entre los coliformes, usar 100 mg de 4-metil-umbeliferil-D glucurónido (MUG) por cada litro de RVBA y observar la fluorescencia de las colonias bajo luz ultravioleta de onda larga. La presencia de fluorescencia indica prueba positiva a *E. coli*

5.3.8 Expresión de resultados

Considerar las cuentas de placas que estén entre 25 a 250 UFC para el informe. Multiplicar por el inverso de la dilución, tomando los criterios establecidos en el método para la cuenta de bacterias aerobias en placa como se describe en el numeral 5.2.6.1.

5.3.9 Informe de la prueba

UFC coliformes totales /g, mL o superficie UFC <i>E. coli</i> /g, mL o superficie
--

5.4 Estimación de la densidad microbiana por la técnica del número más probable.

5.4.1 Principio del método

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 y 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 crecen en el medio, cuando son incubados y se mantienen en las condiciones adecuadas para su desarrollo.

Si se espera una cuenta microbiana alta, la muestra debe 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. A medida que el número de tubos inoculados para cada dilución aumentan se reducen los límites de confianza.

5.4.2 Uso de tablas de NMP con 95% de límite de confianza.

5.4.2.1 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 debe 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) conforme a lo establecido en las tablas 4 y 5; también se puede aplicar una ecuación de conformidad con el numeral 5.4.3, para obtener el NMP aproximado.

5.4.2.2 El intervalo de 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 es correcto el 95% de las veces. El valor del NMP tabulado representa un intervalo y no un valor absoluto.

5.4.2.3 Cuando se preparan más de 3 diluciones de una muestra, el NMP se determina a partir de tres diluciones consecutivas de acuerdo con las 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 conforme a lo establecido en los incisos A y B de las tablas 6 y 7. Cuando en ninguna de las diluciones probadas se observe crecimiento, seleccionar (si es posible) las tres primeras diluciones consecutivas (volumen de muestra) para que la dilución media contenga resultados positivos como se señala en el inciso C de las tablas 6 y 7.

5.4.2.4 Con frecuencia es necesario calcular el NMP desde el inicio con volúmenes diferentes de los enlistados en las tablas 1-5.

5.4.2.5 Si el volumen de muestra es mayor que 0,01 g, multiplicar por 10 el valor de NMP enlistado en la tabla.

5.4.2.6 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) se considera una lectura de 17 tal y como se señala en la tabla No. 2. Multiplicar este valor por 10 para así obtener 170, el cual se considera como el NMP actual por gramo de muestra.

5.4.2.7 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 sp* 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.

5.4.2.8 Un método alternativo para obtener el número más probable es usando la siguiente fórmula:

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

Para calcular el NMP/100 g multiplicar por 100.

5.4.3 Cálculo aproximado del NMP y 95% de límite de confianza.

Para calcular los límites de confianza del NMP lo más común es el uso de tablas. Generalmente estas tablas están limitadas al uso de 3, 5 y 10 tubos por dilución. Incluso usando un método aceptado, pueden presentarse datos irregulares o accidentes de laboratorio que causan pérdida de 1 o más tubos de dilución. En este caso, una serie de diluciones de por ejemplo: 5,4,4 puede dar una lectura de 5-2-0. Para estos casos se puede aplicar una fórmula sencilla, la cual no corresponde exactamente con los resultados obtenidos teóricamente; sin embargo, las desviaciones generalmente son pequeñas. Esta fórmula no debe ser aplicada para fines de regulación. La fórmula no restringe el número de tubos o las diluciones y puede aplicarse para todo tipo de pruebas. El cálculo aproximado está dado por la siguiente ecuación:

$$NMP/g = P/(N T)^{1/2}$$

Donde:

P es el número de tubos positivos.

N es la cantidad total de muestra (g) en todos los tubos negativos

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 $T = 5 (8+4+2+1+0,5+0,25) = 78,75$

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

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

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

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 debe ser de $1,14(n)^{1/2}$ para la mejor estimación. Si el número de tubos por dilución (n_i) es desigual (por ejemplo: un accidente de laboratorio) para la dilución k reemplazar n por la expresión n_H (media armónica) por el número de tubos por dilución (n_i).

La media armónica se define como:

$$n_H = k/\Sigma(1/n_i)$$

k es el número de diluciones. Por ejemplo: Suponiendo que el resultado de 3 diluciones en n_i fuera 5-4-4. Por lo tanto $n_H = 3/[(1/5) + (1/4) + (1/4)]^{1/2} = 3/0,70 = 4,3^i$

Para el ejemplo anterior el NMP con $n = 5$ y un límite de confianza aproximado de 95% es el siguiente:

$$\log 0,32 \pm (1,08) [(\log 2)/5]^{1/2}$$

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

Entonces el límite inferior es el antilogaritmo $(-0,76) = 0.17/g$ o $17/100g$ 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 $0,57/g$.

5.4.4 Tablas para el cálculo del NMP

Tabla 1

Selección del NMP con un límite de confianza de 95% para la prueba de fermentación utilizando 3 tubos con porciones de 0,1, 0,01 y 0,001 g (mL) de muestra^a.

No. de tubos positivos			NMP/g (mL) ^b	95% de límite de confianza	
0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior
0	0	0	<3	---	---
0	1	0	3+	<1	17
1	0	0	4	<1	21
1	0	1	7+	2	27
1	1	0	7	2	28
1	2	0	11+	4	35
2	0	0	9	2	38
2	0	1	14+	5	48
2	1	0	15	5	50
2	1	1	20+	7	60
2	2	0	21	8	62
3	0	0	23	9	130
3	0	1	39	10	180
3	1	0	43	10	210
3	1	1	75	20	280
3	2	0	93	30	380
3	2	1	150	50	500
3	2	2	210+	80	640
3	3	0	240	90	1400
3	3	1	460	100	2400
3	3	2	1100	300	4800
3	3	3	>1100	---	---

^aLos resultados normales, obtenidos en un 95% de las pruebas no están seguidos por un símbolo más (+). Menos del 4% de los resultados de las pruebas obtenidos están marcados por un símbolo más (+). Combinaciones de tubos positivos no encontrados en esta tabla se presentan en menos del 1% de las pruebas y si se presentaran con mayor frecuencia indican un error de técnica o que el valor del número más probable se encuentra en el límite. El NMP de combinaciones que no aparecen en la tabla, se puede obtener por extrapolación a la combinación cercana más elevada.

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

Tabla 2

Selección del NMP con un límite de confianza de 95% para la prueba de fermentación utilizando 5 tubos:
con porciones de 0,1, 0,01 y 0,001 g (mL) de muestra^a.

<u>No. de tubos positivos</u>			NMP/g (mL)^b	<u>95% de límite de confianza</u>	
0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior
0	0	0	<2	---	---
0	0	1	2+	<1	10
0	1	0	2	<1	10
1	0	0	2	<1	11
1	0	1	4+	1	15
1	1	0	4	1	15
1	2	0	6+	2	18
2	0	0	4	1	17
2	0	1	7+	2	20
2	1	0	7	2	21
2	1	1	9+	3	25
2	2	0	9	3	25
3	0	0	8	3	24
3	0	1	11	4	29
3	1	0	11	4	30
3	1	1	14+	6	35
3	2	0	14	6	35
3	2	1	17+	7	40
3	3	0	17+	7	41
4	0	0	13	5	38
4	0	1	17	7	45
4	1	0	17	7	46
4	1	1	21	9	55
4	2	0	22	9	56
4	2	1	26+	12	65
4	3	0	27	12	67
4	3	1	33+	15	77
4	4	0	34+	16	80
5	0	0	23	9	68
5	0	1	31	13	110
5	1	0	33	14	120
5	1	1	46	20	150
5	1	2	63+	22	180
5	2	0	49	21	170
5	2	1	70	30	210
5	2	2	94+	40	250
5	3	0	79	30	250
5	3	1	110	40	300

5	3	2	140	60	360
5	4	0	130	50	390
5	4	1	170	70	480
5	4	2	220	100	580
5	4	3	280+	120	690
5	4	4	350+	160	820
5	5	0	240	100	940
5	5	1	350	100	1300
5	5	2	540	220	2000
5	5	3	920	300	2900
5	5	4	1600	600	5300
5	5	5	>1600	---	---

^aLos resultados normales, obtenidos en un 95% de las pruebas, no están seguidos por un símbolo más(+). Menos del 4% de los resultados de las pruebas obtenidos están marcados por un símbolo más (+). Combinaciones de tubos positivos no encontrados en esta tabla se presentan en menos del 1% de las pruebas y si se presentaran con mayor frecuencia indican un error de técnica o que el valor del número más probable se encuentra en el límite. El NMP de combinaciones que no aparecen en la tabla, se pueden obtener por extrapolación a la combinación cercana más elevada.

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

Tabla 3

Selección del NMP con un límite de confianza de 95% para la prueba de fermentación utilizando 10 tubos: con porciones de 0,1, 0,01 y 0,001 g (mL) de muestra^a.

<u>No. de tubos positivos</u>			<u>NMP/g (mL)^b</u>	<u>95% de límite de confianza</u>	
<u>0,1</u>	<u>0,01</u>	<u>0,001</u>		<u>Inferior</u>	<u>Superior</u>
0	0	0	<1	---	---
0	0	1	1+	<1	6
0	1	0	1	<1	5
0	2	0	2+	<1	7
1	0	0	1	<1	5
1	0	1	2+	<1	7
1	1	0	2	<1	7
1	2	0	3+	1	8
2	0	0	2	<1	7
2	0	1	3+	1	9
2	1	0	3	1	9
2	1	1	4+	1	10
2	2	0	4	2	10
2	3	0	5+	2	12
3	0	0	3	1	9
3	0	1	4	2	11
3	1	0	4	2	11
3	1	1	5+	2	13
3	2	0	5	2	13
3	2	1	6+	3	14

3	3	0	6+	3	14
4	0	0	4	2	12
4	0	1	6	2	13
4	1	0	6	2	14
4	1	1	7	3	15
4	2	0	7	3	15
4	2	1	8	4	17
4	3	0	8	4	17
4	4	0	9+	5	19
5	0	0	6	2	15
5	0	1	7	3	16
5	1	0	7	3	17
5	1	1	9	4	18
5	2	0	9	4	18
5	2	1	10+	5	20
5	3	0	10	5	20
5	3	1	11+	6	22
5	4	0	11+	6	22
6	0	0	8	3	18
6	0	1	9	4	20
6	1	0	9	4	20
6	1	1	11	5	22
6	2	0	11	5	22
6	2	1	12	6	24
6	3	0	12	6	25
6	3	1	14+	7	27
6	4	0	14+	7	27
6	5	0	15+	8	29
7	0	0	10	5	22
7	0	1	12	6	24
7	0	2	13+	7	27
7	1	0	12	6	25
7	1	1	13	7	27
7	1	2	15+	8	30
7	2	0	13	7	27
7	2	1	15	8	30
7	2	2	17+	9	32
7	3	0	15	8	30
7	3	1	17	9	33
7	4	0	17	9	33
7	4	1	19+	10	36
7	5	0	19+	10	36
8	0	0	13	6	28

8	0	1	15	7	31
8	0	2	17+	8	34
8	1	0	15	7	31
8	1	1	17	9	34
8	1	2	19+	10	37
8	2	0	17	9	35
8	2	1	19	10	38
8	2	2	21+	12	42
8	3	0	19	10	39
8	3	1	21	12	42
8	3	2	24+	13	46
8	4	0	22	12	43
8	4	1	24	13	46
8	5	0	24	13	47
8	5	1	27+	15	51
8	6	0	27+	15	52
9	0	0	17	8	37
9	0	1	19	10	41
9	0	2	22+	11	46
9	1	0	19	10	42
9	1	1	22	11	47
9	1	2	25+	13	52
9	2	0	22	12	47
9	2	1	25	13	53
9	2	2	28+	15	58
9	3	0	25	13	54
9	3	1	29	15	60
9	3	2	32+	18	66
9	4	0	29	16	61
9	4	1	33	18	67
9	4	2	37+	20	74
9	5	0	33	18	69
9	5	1	37	20	76
9	5	2	42+	23	83
9	6	0	38	21	77
9	6	1	43+	24	85
9	7	0	44+	24	87
10	0	0	23	12	58
10	0	1	27	14	67
10	0	2	31+	16	77
10	1	0	27	14	69
10	1	1	32	17	79
10	1	2	38	20	92

10	2	0	33	17	83
10	2	1	39	20	96
10	2	2	50	20	110
10	2	3	50+	30	120
10	3	0	40	20	100
10	3	1	50	20	120
10	3	2	60+	30	130
10	3	3	70+	30	150
10	4	0	50	30	120
10	4	1	60	30	140
10	4	2	70	30	160
10	4	3	80+	40	170
10	5	0	60	30	150
10	5	1	70	40	170
10	5	2	90	40	190
10	5	3	100	50	210
10	6	0	80	40	180
10	6	1	90	50	200
10	6	2	110	50	230
10	6	3	120	60	250
10	6	4	140+	70	270
10	7	0	100	50	220
10	7	1	120	60	250
10	7	2	140	70	280
10	7	3	150	80	310
10	7	4	170+	90	340
10	8	0	130	60	280
10	8	1	150	80	320
10	8	2	170	90	360
10	8	3	200	100	400
10	8	4	220	120	440
10	8	5	250+	140	480
10	9	0	170	90	380
10	9	1	200	100	430
10	9	2	230	120	490
10	9	3	260	140	560
10	9	4	300	160	640
10	9	5	350	180	720
10	9	6	400+	210	820
10	10	0	240	120	610
10	10	1	290	150	750
10	10	2	350	170	910
10	10	3	400	200	1100

10	10	4	500	300	1400
10	10	5	700	300	1700
10	10	6	900	400	2100
10	10	7	1120	600	2700
10	10	8	1160	800	3700
10	10	9	2300	1100	6000
10	10	10	>2300	---	---

^aLos resultados normales, obtenidos en un 95% de las pruebas, no están seguidos por un símbolo más(+). Menos del 4% de los resultados de las pruebas obtenidos están marcados por un símbolo más(+). Combinaciones de tubos positivos no encontrados en esta tabla se presentan en menos del 1% de las pruebas y si se presentan con mayor frecuencia indican un error de técnica o que el valor del número más probable se encuentra en el límite. El NMP de combinaciones que no aparecen en la tabla, se pueden obtener por extrapolación a la combinación cercana más elevada.

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

Tabla 4

Número Más Probable (NMP) para 1 g de muestra cuando se usan 3 tubos con porciones de 0,1, 0,01 y 0,001g

Tubos Positivos				Tubos Positivos			
0,1	0,01	0.001	NMP	0,1	0,01	0,001	NMP
0	0	0	<3	2	0	0	9,1
0	0	1	3	2	0	1	14
0	0	2	6	2	0	2	20
0	0	3	9	2	0	3	26
0	1	0	3	2	1	0	15
0	1	1	6,1	2	1	1	20
0	1	2	9,2	2	1	2	27
0	1	3	12	2	1	3	34
0	2	0	6,2	2	2	0	21
0	2	1	9,3	2	2	1	28
0	2	2	12	2	2	2	35
0	2	3	16	2	2	3	42
0	3	0	9,4	2	3	0	29
0	3	1	13	2	3	1	36
0	3	2	16	2	3	2	44
0	3	3	19	2	3	3	53
1	0	0	3,6	3	0	0	23
1	0	1	7,2	3	0	1	39
1	0	2	11	3	0	2	64
1	0	3	15	3	0	3	95
1	1	0	7,3	3	1	0	43
1	1	1	11	3	1	1	75
1	1	2	15	3	1	2	120

1	1	3	19	3	1	3	160
1	2	0	11	3	2	0	93
1	2	1	15	3	2	1	150
1	2	2	20	3	2	2	210
1	2	3	24	3	2	3	290
1	3	0	16	3	3	0	240
1	3	1	20	3	3	1	460
1	3	2	24	3	3	2	1100
1	3	3	29	3	3	3	>1100

Tabla 5

Número Más Probable (NMP) para 100 mL de muestra cuando se usan 5 porciones en cada una de 3 diluciones con series geométricas.

Tubos Positivos				Tubos Positivos			
0,1	0,01	0,001	NMP	0,1	0,01	0,001	NMP
0	0	0	---	3	0	0	7,8
0	0	2	3,6	3	0	2	13
0	0	3	5,4	3	0	3	25
0	0	4	7,2	3	0	4	20
0	0	5	9,0	3	0	5	23
0	1	0	1,8	3	1	0	11
0	1	1	3,6	3	1	1	14
0	1	2	5,5	3	1	2	17
0	1	3	7,3	3	1	3	20
0	1	4	9,1	3	1	4	23
0	1	5	11	3	1	5	27
0	2	0	3,7	3	2	0	14
0	2	1	5,5	3	2	1	17
0	2	2	7,4	3	2	2	20
0	2	3	9,2	3	2	3	24
0	2	4	11	3	2	4	27
0	2	5	13	3	2	5	31
0	3	0	5,6	3	3	0	17
0	3	1	7,4	3	3	1	21
0	3	2	9,3	3	3	2	24
0	3	3	11	3	3	3	28
0	3	4	13	3	3	4	31
0	3	5	15	3	3	5	35
0	4	0	7,5	3	4	0	21
0	4	1	9,4	3	4	1	24
0	4	2	11	3	4	2	28
0	4	3	13	3	4	3	32

0	4	4	15	3	4	4	36
0	0	1	1,8	3	0	1	11
0	4	5	17	3	4	5	40
0	5	0	9,4	3	5	0	25
0	5	1	11	3	5	1	29
0	5	2	13	3	5	2	32
0	5	3	15	3	5	3	37
0	5	4	17	3	5	4	41
0	5	5	19	3	5	5	45
1	0	0	2	4	0	0	13
1	0	1	4	4	0	1	17
1	0	2	6	4	0	2	21
1	0	3	8	4	0	3	25
1	0	4	10	4	0	4	30
1	0	5	12	4	0	5	36
1	1	0	4	4	1	0	17
1	1	1	6,1	4	1	1	21
1	1	2	8,1	4	1	2	26
1	1	3	10	4	1	3	31
1	1	4	12	4	1	4	35
1	1	5	14	4	1	5	42
1	2	0	6,1	4	2	0	22
1	2	1	8,2	4	2	1	26
1	2	2	10	4	2	2	32
1	2	3	12	4	2	3	38
1	2	4	15	4	2	4	44
1	2	5	17	4	2	5	50
1	3	0	8,3	4	3	0	27
1	3	1	10	4	3	1	33
1	3	2	13	4	3	2	39
1	3	3	15	4	3	3	45
1	3	4	17	4	3	4	52
1	3	5	19	4	3	5	59
1	4	0	11	4	4	0	34
1	4	1	13	4	4	1	40
1	4	2	15	4	4	2	47
1	4	3	17	4	4	3	54
1	4	4	19	4	4	4	62
1	4	5	22	4	4	5	69
1	5	0	13	4	5	0	41
1	5	1	15	4	5	1	48
1	5	2	17	4	5	2	56
1	5	3	19	4	5	3	64

1	5	4	22	4	5	4	72
1	5	5	24	4	5	5	81
2	0	0	4,5	5	0	0	23
2	0	1	6,8	5	0	1	31
2	0	2	9,1	5	0	2	43
2	0	3	12	5	0	3	58
2	0	4	14	5	0	4	76
2	0	5	16	5	0	5	95
2	1	0	6,8	5	1	0	33
2	1	1	9,2	5	1	1	46
2	1	2	12	5	1	2	64
2	1	3	14	5	1	3	84
2	1	4	17	5	1	4	110
2	1	5	19	5	1	5	130
2	2	0	9,3	5	2	0	49
2	2	1	12	5	2	1	70
2	2	2	14	5	2	2	95
2	2	3	17	5	2	3	120
2	2	4	19	5	2	4	150
2	2	5	22	5	2	5	180
2	3	0	12	5	3	0	79
2	3	1	14	5	3	1	110
2	3	2	17	5	3	2	140
2	3	3	20	5	3	3	180
2	3	4	22	5	3	4	210
2	3	5	25	5	3	5	250
2	4	0	15	5	4	0	130
2	4	1	17	5	4	1	170
2	4	2	20	5	4	2	220
2	4	3	23	5	4	3	280
2	4	4	25	5	4	4	350
2	4	5	28	5	4	5	430
2	5	0	17	5	5	0	240
2	5	1	20	5	5	1	350
2	5	2	23	5	5	2	540
2	5	3	26	5	5	3	920
2	5	4	29	5	5	4	1600
2	5	5	32	---	---	---	---

Tabla 6

Ejemplos para determinar el NMP estimado en series de tres tubos con 1g (mL) de muestra por tubo.

Ejemplo	Cantidad de muestra (g o mL) ^a					Valores positivos reportados	NMP estimado/g o mL ^b
	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001		
A	3/3	3/3	2/3	0/3	0/3	3-2-0	930

B	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3	3-2-0	9300
C	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0-1-0	30
D	3/3	3/3	2/3	1/3	1/3	3-2-2	2100
E	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3-3-3	>110000

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

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

Tabla 7

Ejemplos para determinar el NMP estimado en series de 5 tubos con 1 g (mL) de muestra por tubo.

Ejemplo	Cantidad de muestra (g o mL) ^a					Valores positivos reportados	NMP estimado/g o mL ^b
	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001		
A	5/5	5/5	2/5	0/5	0/5	5-2-0	490
B	5/5	5/5	5/5	2/5	0/5	5-2-0	4900
C	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0-1-0	20
D	5/5	5/5	3/5	1/5	1/5	5-2-2	1400
E	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5-5-5	>160000

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

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

Tabla 8

Índice del NMP con 95% de límite de confianza para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan 5 tubos con 20 mL de muestra de agua o hielo.

No. de Tubos Positivos	NMP/100 mL	95% de Límite de Confianza (aproximado)	
		Inferior	Superior
0	<1,1	0	3,0
1	1,1	0,05	6,3
2	2,6	0,3	9,6
3	4,6	0,8	14,7
4	8,0	1,7	26,4
5	>8,0	4,0	Infinito

Tabla 9

Índice del NMP con 95% de límite de confianza para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan 10 tubos con 10 mL de muestra de agua o hielo.

No. de Tubos Positivos	NMP/100 mL	95% de Límite de Confianza (aproximado)	
		Inferior	Superior

0	<1,1	0,0	3,0
1	1,1	0,03	5,9
2	2,2	0,26	8,1
3	3,6	0,69	10,6
4	5,1	1,3	13,4
5	6,9	2,1	16,8
6	9,2	3,1	21,1
7	12,0	4,3	27,1
8	16,1	5,9	36,8
9	23,0	8,1	59,5
10	>23,0	13,5	Infinito.

5.5. Determinación de bacterias coliformes totales por la técnica de tubos de dilución múltiple.

5.5.1 Principio del método.

Se basa en la propiedad de los microorganismos coliformes para producir gas a partir de la fermentación de la lactosa dentro de las 24-48 horas de incubación a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ (coliformes totales).

Este método aplica para agua apta para consumo humano, hielo y alimentos procesados térmicamente, cuando la densidad bacteriana se encuentra en bajas concentraciones (≤ 10 UFC por g o mL) o en alimentos que por su consistencia pueda interferir con la exactitud de la cuenta en placa.

5.5.2 Equipo.

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

5.5.2.2 Autoclave verificada con termómetro de máximas y manómetro calibrado.

5.5.2.3 Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 1^\circ\text{C}$.

5.5.2.4 Campana de flujo laminar (opcional).

5.5.3. Materiales.

5.5.3.1 Pipetas bacteriológicas graduadas de 1 y 10 mL (o si es necesarios de 1 y 2 mL), con tapón de algodón y con divisiones de 0,1 mL.

5.5.3.2 Campanas de fermentación (tubos de Durham)

5.5.3.3 Asas bacteriológicas

5.5.3.4 Tubos de cultivo de 16 x 120 y 20 x 200 mm con tapón de rosca.

5.5.3.5 Mecheros Bunsen o Fisher

5.5.3.6 Propipetas

5.5.3.7 Pipeta electrónica programable (opcional)

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

a) Horno, durante 2 h a 170 a 175°C o 1 h a 180 a 185°C o

b) Autoclave, durante 15 minutos como mínimo a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

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

5.5.4 Medios de cultivo.

En el caso de utilizar medio de cultivo deshidratado, seguir las instrucciones del fabricante.

5.5.4.1 Caldo lauril sulfato de sodio

Ingredientes	Cantidades
Triptosa o tripticaseína	20 g
Lactosa	5 g

Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	2,75 g
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	2,75 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Lauril sulfato de sodio	0,1 g
Agua destilada	1 L

pH final: 6,8 ± 0,2

Preparación:

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Ajustar el pH. Distribuir en porciones de 10 mL en tubos de ensayo con campanas de Durham.

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 ± 1°C.

Antes de abrir el autoclave, dejar bajar la temperatura a 75°C para que no queden burbujas en las campanas de Durham.

Tabla 1. Preparación del caldo lauril sulfato de sodio

Inóculo (mL)	Cantidad de medio por tubo (mL)	Volumen de medio mas inóculo (mL)	Caldo lauril sulfato de sodio requerido g/L
1	10 o más	11 o más	35,6
10	10	20	71,2
10	20	30	53,4
20	10	30	106,8
100	50	150	106,8
100	35	135	137,1
100	20	120	213,6

5.5.4.2 Caldo lactosa bilis verde brillante, preparar como se describe en el numeral 5.3.4.2.

5.5.5 Preparación de la muestra.

5.5.5.1 Para agua y hielo.

Agitar la muestra y transferir volúmenes de 10 mL a cada uno de 5 tubos con 20 mL de caldo lauril sulfato de sodio de doble concentración, 5 tubos con 1 mL y 5 tubos con 0,1 mL de caldo lauril sulfato de sodio de concentración sencilla o las siguientes porciones: 10 tubos con 10 mL de muestra; 5 tubos con 20 mL de muestra o una porción de 100 mL, como se señala la tabla 1 y conforme a lo establecido en el numeral 5.5.4.1 para la concentración de caldo lauril sulfato de sodio requerido. Los tubos deben contener una campana de fermentación (Durham).

5.5.5.2 Para alimentos

5.5.5.2.1 Preparar la muestra como se describe en el numeral 5.1. Preparar suficiente número de diluciones para asegurar que todos los tubos correspondientes a la última dilución rindan un resultado negativo.

5.5.5.2.2 Tomar tres tubos de caldo lauril sulfato de sodio 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.

5.5.5.2.3 Tomar tres tubos de caldo lauril sulfato de sodio de concentración sencilla. Usar una pipeta estéril para transferir a cada uno de éstos 1 mL de la muestra si es líquida o 1 mL de la dilución primaria en el caso de otros productos.

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

5.5.6 Prueba presuntiva

Incubar los tubos a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Examinar los tubos a las 24 horas y observar si hay formación de gas; si la formación de gas no se observa, incubar 24 horas más.

5.5.7 Prueba confirmatoria

5.5.7.1 De cada tubo que muestre formación de gas, tomar una asada y sembrar en un número igual de tubos con caldo lactosa bilis verde brillante. Incubar a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 h o si la formación de gas no se observa en este tiempo, incubar por 24 ± 2 h más. La formación de gas en los tubos de fermentación confirma un resultado positivo para coliformes totales.

5.5.7.2 Alternativamente y sólo para el análisis de muestras de agua para consumo humano, puede utilizarse el método del sustrato cromogénico establecido en el apéndice informativo A de la NOM-180-SSA1-1998 citada en el apartado de referencias.

5.5.8 Expresión de resultados.

Tomar la serie de tubos de la parte confirmatoria en la cual existe formación de gas después del periodo de incubación y calcular el NMP en las tablas correspondientes como se describe en el numeral 5.4.4.

5.5.9 Informe de la prueba.

Coliformes totales NMP/g o mL en alimentos Coliformes totales NMP/100 mL en agua

5.6 Determinación de coliformes fecales y *Escherichia coli* por la técnica de tubos de dilución múltiple.

5.6.1 Principio del método.

Se basa en la propiedad de los microorganismos coliformes fecales y *E. coli* para producir gas a partir de la fermentación de la lactosa dentro de las 24-48 horas de incubación a $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

Por otra parte alrededor de 94% de las cepas de *E. coli* incluso las cepas no productoras de gas producen la enzima beta-glucuronidasa (GUD), la cual rompe el sustrato específico 4-metilumbeliferil-beta-D-glucurónido (MUG) en 4-metilumbeliferona (MU), que al ser expuesto a una fuente de luz ultravioleta (UV) de onda larga (365 nm) produce una fluorescencia azul, fácil de observar. Cuando el MUG es incorporado al caldo EC se puede identificar *E.coli*.

5.6.2. Equipo.

Además de lo establecido en el numeral 5.5.2 se requiere el siguiente:

5.6.2.1 Baño de agua con recirculación a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ (baño metabólico).

5.6.2.2 Lámpara de luz ultravioleta de onda larga (365 nm).

5.6.3 Materiales.

5.6.3.1 Material general.

El mismo que se describe en el numeral 5.5.3

5.6.3.2. Material biológico.

Cepas de referencia de *E. coli*, *E. aerogenes* o *K. pneumoniae*.

5.6.4 Reactivos.

Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y para efectos de este método por agua se entiende agua destilada.

5.6.4.1 Reactivo de Kovacs

Ingredientes:	Cantidades
p-Dimetilaminobenzaldehido	5 g
Alcohol amílico (normal)	75 mL
Acido clorhídrico concentrado (HCl)	25 mL

Disolver el p-Dimetilaminobenzaldehido en alcohol amílico normal. Adicionar lentamente el HCl. Conservar en frasco color ámbar y en refrigeración.

5.6.4.2 Reactivo de Voges-Proskauer (VP)

Solución 1

Ingredientes:	Cantidades
alfa-naftol	5 g
Alcohol etílico absoluto	100 mL

Solución 2

Ingredientes:	Cantidades
Hidróxido de potasio (KOH)	40 g
Agua destilada	para llevar a 100 mL

5.6.4.3 Indicador rojo de metilo

Ingredientes:	Cantidades
Rojo de metilo	0,10 g
Etanol al 95%	300 mL
Agua destilada	para llevar a 500 mL

Disolver el rojo de metilo en 300 mL de etanol. Llevar el volumen a 500 mL con agua destilada.

5.6.4.4 Reactivos para la tinción de Gram.

5.6.4.4.1 Alcohol-acetona

Mezclar 700 mL de etanol al 95% con 300 mL de acetona.

5.6.4.4.2 Cristal violeta.

Solución A

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

Solución B

Ingredientes:	Cantidades
Oxalato de amonio	0,8 g
Agua destilada	80 mL

Mezclar las soluciones A y B. Almacenar durante 24 h y filtrar a través de un papel filtro grueso.

5.6.4.4.3 Yodo de Gram.

Ingredientes:	Cantidades
Yodo	1g
Yoduro de potasio (KI)	2 g
Agua destilada	300 mL

Colocar el KI en un mortero. Adicionar el yodo. Triturar con el pistilo por 5-10 segundos. Adicionar 1 mL de agua y triturar. Adicionar 5 mL de agua y triturar. Adicionar 10 mL de agua y triturar. Vaciar esta solución en una botella de reactivo. Enjuagar el mortero y el pistilo con la cantidad de agua necesaria para completar un volumen de 300 mL.

5.6.4.4.4 Colorante de contraste (solución concentrada).

Ingredientes:	Cantidades
Safranina O	2,5 g
Etanol al 95%	100 mL

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

5.6.5 Medios de cultivo.

En el caso de utilizar medio de cultivo deshidratado, seguir las instrucciones del fabricante.

5.6.5.1 Caldo EC

Ingredientes:	Cantidades
Triptosa o tripticaseína	20 g
Lactosa	5 g
Sales biliares No. 3	1,5 g
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	4 g
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	1,5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Agua destilada	1 L

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

Preparación:

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada y calentar ligeramente hasta disolución completa. Ajustar el pH.

Distribuir en tubos de ensayo con campanas de Durham. Adicionar 10 mL de medio para cada tubo.

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a $121 \pm 1^\circ C$. Antes de abrir el autoclave, dejar bajar la temperatura a $75^\circ C$ para evitar que queden burbujas en las campanas de Durham.

5.6.5.2 Agar eosina azul de metileno de Levin (EMB-L).

Ingredientes:	Cantidades
Peptona	10 g
Lactosa	10 g
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	2 g
Agar	15 g
Eosina Y	0,4 g
Azul de metileno	0,065 g
Agua destilada	1 L

pH final: $7,1 \pm 0,2$

Preparación:

Disolver la peptona, el fosfato y el agar en un litro de agua. Calentar a ebullición para la disolución completa.

Distribuir en porciones de 100 o 200 mL y esterilizar a no más de $121 \pm 1^\circ C$ 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%.

5.6.5.3 Caldo triptona al 1% (triptofano).

Ingredientes:	Cantidades
Triptona o tripticaseína	10 g

Agua destilada 1 L

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

Preparación:

Disolver los ingredientes. Distribuir en porciones de 5 mL en tubos de ensaye de 16 x 125 o 16 x 150 mm. Ajustar el pH.

Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

5.6.5.4 Caldo MR-VP (rojo de metilo-Voges Proskauer).

Ingredientes:	Cantidades
Peptona tamponada	7 g
Glucosa	5 g
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	5 g
Agua destilada	1 L

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

Suspender los ingredientes en el agua destilada y calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta lograr una disolución completa. Ajustar el pH.

Distribuir el medio en volúmenes de 3 mL en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

5.6.5.5 Caldo citrato de Koser.

Ingredientes:	Cantidades
Fosfato de amonio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	1,5 g
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	1 g
Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,2 g
Citrato de sodio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	3 g
Agua destilada	1 L

pH final: $6,7 \pm 0,2$.

Distribuir preferentemente en tubos de ensaye con tapa de rosca. Ajustar el pH. Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

La formulación del medio deshidratado disponible comercialmente difiere de la señalada anteriormente, sin embargo se puede emplear para llevar a cabo la prueba correspondiente.

5.6.5.6 Medio EC-MUG

Preparar el caldo EC y adicionar 50 mg de 4-metilumbeliferil-beta-D-glucurónido (MUG) por litro antes de esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

5.6.5.7 Agar citrato de Simmons

Ingredientes	Cantidades
Fosfato de amonio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)	1 g
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	1 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Citrato de sodio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2 g
Sulfato de magnesio (MgSO_4)	0,2 g
Azul de bromotimol	0,08 g
Agar	15 g

Agua destilada

1 L

pH final: $6,8 \pm 0,2$

Preparación:

Suspender los ingredientes en el agua destilada y calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta lograr una disolución completa. Ajustar el pH.

Distribuir el medio en volúmenes de 3 mL en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min. Dejar enfriar los tubos en posición inclinada.

5.6.6 Prueba confirmatoria para coliformes fecales.

5.6.6.1 De cada tubo que muestre formación de gas en la prueba presuntiva para coliformes totales de conformidad con el numeral 5.5.6, tomar una asada y sembrar en un número igual de tubos con caldo EC. Inocular a dos tubos con caldo EC una cepa de *E. coli* como control positivo y una de *Enterobacter aerogenes* como control negativo.

5.6.6.2 Incubar los tubos a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ en baño de agua con agitación durante 24 horas, observar si hay formación de gas; si la formación de gas no se observa, continuar la incubación 24 horas más, y hacer la lectura. La formación de gas en los tubos de fermentación confirma un resultado positivo para coliformes fecales. Utilizar estos resultados para calcular el número más probable (NMP) de coliformes fecales.

5.6.7 Prueba confirmatoria para *Escherichia coli* por identificación bioquímica.

5.6.7.1 Tomar una asada de cada uno de los tubos positivos para coliformes fecales y sembrar por estría cruzada en agar EMB-L como se describe en el numeral 5.6.5.2 para su aislamiento.

5.6.7.2 Incubar las placas invertidas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18-24 horas.

5.6.7.3 Seleccionar de cada placa las colonias que presenten la siguiente morfología colonial: colonias con centro negro, planas con o sin brillo metálico. Sembrar las colonias seleccionadas en agar cuenta estándar el cual se describe en el numeral 5.2.4, para realizar las pruebas de morfología microscópica y pruebas bioquímicas. Incubar las placas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18-24 horas.

5.6.7.4 Si no hay desarrollo de colonias con morfología típica, probar una o más colonias lo más parecido a *E. coli* de cada placa.

5.6.7.5 Efectuar las siguientes pruebas bioquímicas (IMVIC):

a) Producción de indol.

Inocular un tubo en caldo triptona e incubarlo a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 horas. Adicionar 0,2-0,3 mL de reactivo de Kovacs. La presencia de una coloración roja en la superficie del tubo se considera una prueba positiva.

b) Voges-Proskauer (VP)

Inocular un tubo con caldo MR-VP e incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 ± 2 horas. Transferir 1 mL a un tubo de 13x100 mm. Adicionar 0,6 mL de solución de alfa naftol (solución 1) y 0,2 mL de hidróxido de potasio al 40% (solución 2) y agitar. Se considera una prueba positiva cuando se desarrolla un color rosa.

c) Rojo de metilo

Inocular un tubo adicional con caldo MR-VP e incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 ± 2 horas. Adicionar 5 gotas de solución de rojo de metilo. Se considera una prueba positiva cuando se desarrolla un color rojo. La aparición de un color amarillo se considera una prueba negativa.

d) Citrato

Inocular en un tubo con caldo citrato de Koser un inóculo ligero para evitar turbiedad. Incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 96 horas. El desarrollo del cultivo que se observa con la turbiedad del medio, se considera una prueba positiva.

Alternativamente puede usarse agar citrato de Simmons donde una prueba positiva se considera por el vire del indicador de verde a azul.

5.6.8 Prueba confirmatoria de *Escherichia coli* por tinción de Gram.

5.6.8.1 De las colonias obtenidas conforme a lo establecido en el numeral 5.6.7.3, hacer un frotis y fijarlo con calor moderado.

5.6.8.2 Adicionar la solución de cristal violeta al frotis. Dejar actuar por un minuto.

5.6.8.3 Lavar con agua corriente y escurrir.

5.6.8.4 Aplicar la solución de yodo por un minuto. Lavar con agua corriente y escurrir.

5.6.8.5 Decolorar con etanol al 95% hasta que la coloración azul deje de fluir (aproximadamente 30 segundos).

5.6.8.6 Inmediatamente después enjuagar con agua corriente y dejar escurrir.

5.6.8.7 Aplicar el colorante de contraste (safranina) por 30 segundos.

5.6.8.8 Enjuagar, escurrir y secar al aire. Observar al microscopio la presencia de bacilos cortos o coccobacilos Gram negativos.

5.6.9 Prueba confirmatoria para *Escherichia coli* por el método de EC-MUG.

5.6.9.1 De cada tubo que muestre formación de gas en la prueba presuntiva para coliformes totales de conformidad con el numeral 5.5.6, tomar una asada y sembrar en un número igual de tubos con medio de confirmación EC-MUG.

5.6.9.2 Adicionalmente inocular a dos tubos con caldo EC-MUG, una cepa de *E.coli* como control positivo y *K. pneumoniae* o *E. aerogenes* como control negativo.

5.6.9.3 Incubar todos los tubos, con uno adicional de caldo EC-MUG sin inóculo, a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ en baño de agua durante 24 horas y observar la formación de gas. Si la formación de gas no se observa continuar la incubación durante 24 horas más.

5.6.9.4 Irradiar los tubos con una fuente de luz UV, observar la fluorescencia y hacer la lectura. Utilizar estos resultados para calcular el número más probable (NMP) de *E.coli*.

5.6.10 Expresión de resultados.

5.6.10.1 La formación de gas en el tubo de fermentación secundario dentro de las 48 ± 2 horas y la demostración de bacilos Gram negativo no esporulados, confirma un resultado positivo para coliformes fecales.

5.6.10.2 En caso de usar volúmenes de 20 mL de muestras de agua en 5 tubos o 10 mL de muestras de agua en 10 tubos, utilizar las tablas 8 y 9 respectivamente de conformidad con el numeral 5.4.4, para el cálculo de NMP/100 mL.

5.6.10.3 Todos los cultivos que:

- a) Fermenten la lactosa con producción de gas dentro de las 24-48 horas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- b) Sean bacilos o coccobacilos Gram negativos no esporulados, y
- c) Se obtenga las siguientes combinaciones para el IMVIC:

Biotipo 1++ - -, o Biotipo 2 - + - -, son consideradas como *E. coli*.

Calcular el NMP de *E. coli* basada en la proporción de los tubos positivos de caldo EC.

5.6.11 Informe de la prueba.

Coliformes fecales o *E. coli* NMP/g o mL en alimentos
Coliformes fecales o *E. coli* NMP/100 mL en agua

5.7 Determinación de bacterias coliformes totales y fecales por el método de filtración de membrana.

Para efectuar este método remitirse a la NOM-180-SSA-1998, citada en el apartado de referencias.

5.8 Cuenta de mohos y levaduras en placa.

5.8.1 Principio del método

Se basa en inocular una cantidad conocida de muestra de prueba en un medio selectivo específico, acidificado a un pH de 3,5 e incubado a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, dando como resultado el crecimiento de colonias características para este tipo de microorganismos.

5.8.2 Equipo.

El mismo conforme a lo establecido en el numeral 5.2.2.

5.8.3 Materiales.

Los mismos de conformidad con el numeral 5.2.3.

5.8.4 Reactivos.

Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y para efectos de este método por agua se entiende agua destilada.

Solución estéril de ácido tartárico al 10%.

Disolver el ácido en 100 mL de agua y esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos o por filtración a través de membrana de $0,45 \mu\text{m}$.

5.8.5 Medios de cultivo.

En el caso de utilizar medio de cultivo deshidratado, seguir las instrucciones del fabricante.

Agar papa y dextrosa, comercialmente disponible en forma deshidratada.

Preparación:

Seguir las instrucciones del fabricante y después de esterilizar, enfriar en baño de agua a $45 \pm 1^\circ\text{C}$, acidificar a un pH de $3,5 \pm 0,1$ con ácido tartárico estéril al 10% (aproximadamente 1,4 mL de ácido tartárico por 100 mL de medio). Después de adicionar la solución, mezclar y medir el pH con potenciómetro. Dejar solidificar una porción del medio. Hacer esto con cada lote de medio preparado.

A fin de preservar las propiedades gelificantes del medio, no calentar después de agregar el ácido tartárico.

5.8.6 Determinación

5.8.6.1 Proceder como se describe en los numerales 5.2.5.1 a 5.2.5.6 pero utilizando agar papa y dextrosa según lo que establece el numeral 5.8.5.

5.8.6.2 Invertir las cajas y colocarlas en la incubadora a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

5.8.6.3 Contar las colonias de cada placa después de 3 a 5 días de incubación. Después de 5 días, seleccionar aquellas placas que contengan entre 10 y 150 UFC. Si alguna parte de la caja muestra crecimiento extendido de mohos o si es difícil contar colonias bien aisladas, considerar los conteos de 4 días de incubación y aun los de 3 días.

5.8.6.4 Si es necesario, cuando la morfología colonial no sea suficiente, examinar microscópicamente para hacer la distinción entre las colonias de levaduras y mohos de las de bacterias.

5.8.7 Expresión de resultados

Considerar las cuentas de placas que estén entre 10 y 150 UFC para el informe. Multiplicar por el inverso de la dilución, tomando los criterios establecidos en el método para la cuenta de bacterias aerobias en placa conforme a lo establecido en el numeral 5.2.6.1.

5.8.8 Informe de la prueba

UFC de mohos o levaduras /g, mL o superficie
--

5.9 Determinación de *Staphylococcus aureus*.

5.9.1 Principio del método.

Este método permite hacer una estimación del contenido de *Staphylococcus aureus* en alimentos y 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 esperan más de 100 células de *Staphylococcus aureus* por g.

5.9.2 Equipo

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

5.9.2.2 Autoclave verificada con termómetro de máximas y manómetro calibrado.

5.9.2.3 Baño de agua a una temperatura de $45 \pm 2^\circ\text{C}$.

5.9.2.4 Balanza con sensibilidad de 0,1 g.

5.9.2.5 Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 1^\circ\text{C}$.

5.9.3 Materiales

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

5.9.3.2 Tubos de cultivo de 10 mm x 75 mm.

5.9.3.3 Cajas de Petri

5.9.3.4 Pipetas bacteriológicas o graduadas de 1 mL y 10 mL (o si es necesario de 1 y 2 mL), con tapón de algodón y con divisiones de 0,1 mL.

5.9.3.5 Pipetas Pasteur.

5.9.3.6 Probetas.

5.9.3.7 Varillas de vidrio de 3,5 mm de diámetro aproximadamente y 20 cm de largo dobladas en ángulo recto.

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

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

a) Horno, durante 2 h a 170 a 175°C o 1 h a 180 a 185°C o

b) Autoclave, durante 15 minutos como mínimo a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

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

5.9.4 Reactivos.

Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y para efectos de este método por agua se entiende agua destilada.

5.9.4.1 Solución de telurito de potasio

Disolver 1 g de telurito de potasio en 100 mL de agua y esterilizar.

La solución puede ser almacenada por varios meses a temperatura de refrigeración.

5.9.4.2 Solución salina isotónica

Disolver 0,85 g de cloruro de sodio en 100 mL de agua y esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min.

5.9.4.3 Solución de cloruro de calcio 0,01 M

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

5.9.4.4 Solución de azul de toluidina 0,1 M

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

5.9.4.5 Solución amortiguadora 0,05 M Tris-(hidroximetilaminometano) (Tris pH 9)

Disolver 6,055 g de Tris en 100 mL de agua.

5.9.4.6 Plasma de conejo

Emplear plasma de conejo deshidratado o rehidratado siguiendo las instrucciones del fabricante y agregar ácido etilendiaminotetracético (EDTA) en solución al 0,1% en plasma rehidratado. Si se utiliza plasma deshidratado diluir con agua estéril en proporción de 1:3.

Puede emplearse plasma de conejo liofilizado adicionado de EDTA. No debe emplearse sangre citrada.

5.9.5 Medios de cultivo

En caso de disponerse de medios deshidratados, seguir las instrucciones del fabricante.

5.9.5.1 Medio de Baird-Parker

Ingredientes	Cantidades
Medio base	95 mL
Solución de telurito de potasio	1 mL
Emulsión de yema de huevo	5 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 refrigeración.

5.9.5.2 Medio base de Baird-Parker

Ingredientes	Cantidades
Triptona	10 g
Extracto de levadura	1 g
Extracto de carne	5 g
Glicina	12 g
Cloruro de litio (LiCl)	5 g
Piruvato de sodio (C ₃ H ₃ NaO ₃)	10 g
Agar	20 g
Agua	1 L

Preparación:

Disolver los ingredientes o el agar base en agua y calentar con agitación constante y hervir durante 1 min. Esterilizar a 121 ± 1°C durante 15 min.

Enfriar y mantener el medio a 45°C.

5.9.5.3 Emulsión de yema de huevo

Lavar con agua y jabón los huevos frescos que sean necesarios y limpiarlos con una solución de tintura de yodo (solución alcohólica al 2%) o sumergirlos en solución de cloruro mercúrico (1:1000). Enjuagar con agua estéril y secar con gasa estéril.

En campana de flujo laminar o en condiciones asépticas, abrir los huevos y vaciarlos en un separador de claras estéril. Transferir las yemas a una probeta hasta completar un volumen de 60 mL y llevar a 90 mL con solución salina isotónica.

Verter la emulsión a un matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio estériles y agitar vigorosamente para formar la emulsión.

Filtrar a través de gasa. Las placas deben utilizarse dentro de las 48 h siguientes a su preparación.

5.9.5.4 Caldo de infusión cerebro-corazón (BHI)

Ingredientes	Cantidades
Infusión cerebro corazón	200 g
Infusión de corazón de res	250 g
Proteosa peptona o polipeptona	10 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Fosfato disódico (Na ₂ HPO ₄)	2,5 g
Dextrosa	2 g
Agua destilada	1 L

pH final: 7,4 ± 0,2

Preparación:

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

5.9.5.5 Acido desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera.

Ingredientes	Cantidades
Acido desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera o equivalente	0,03 g
Agar	1 g
Cloruro de calcio anhidro 0,01 M (CaCl ₂)	0,1 mL
Cloruro de sodio (NaCl)	1 g
Azul de toluidina 0,1 M	0,30 mL

Tris-(hidroximetil-aminometano) 0,05 M, 100 mL

pH 9

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 portaobjetos 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.

5.9.6 Determinación

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

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

5.9.6.3 Mantener las placas en su posición hasta que el inóculo sea absorbido por el agar. Invertir las placas e incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 45 a 48 h.

5.9.6.4 Seleccionar las placas que tengan entre 15 y 150 UFC típicas de *Staphylococcus aureus*, las cuales tienen las siguientes características: 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.

5.9.6.5 Si no es posible seleccionar placas en el intervalo anterior, elegir las placas de las diluciones más altas aun cuando éstas tengan más de 150 UFC.

5.9.6.6 Cuando las placas tengan menos de 15 UFC típicas, también pueden ser utilizadas y en el informe se debe agregar la nota de "valor estimado".

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

UFC sospechosas	UFC por probar
Menos de 50	3
51 a 100	5
101 a 150 o más	7

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

5.9.6.9 Incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h. Inocular de la misma forma cepas conocidas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* como testigos positivo y negativo, respectivamente.

5.9.6.10 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.

5.9.7 Prueba de coagulasa

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

5.9.7.2 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.

5.9.7.3 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.

5.9.8 Prueba de termonucleasa

5.9.8.1 Calentar en baño de agua hirviendo durante 15 min, un volumen de 0,3 mL de cultivo en caldo de infusión cerebro-corazón.

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

5.9.8.3 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.

5.9.9 Expresión de resultados

5.9.9.1 Cálculos

Hacer el cálculo del contenido de microorganismos en el producto tomando en cuenta las UFC totales, las UFC 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:

$$\frac{80 \times 4}{5} = 64 \times 1000 \times 10 = 640\,000$$

Informar como 640 000 UFC de *Staphylococcus aureus*/g

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:

$$\frac{14 \times 2}{3} = 9,3 \times 10 \times 10 = 930$$

Informar como 930 UFC de *Staphylococcus aureus*/g valor estimado

Si las pruebas confirmatorias resultan negativas en todas las UFC probadas, informar como:

- a) 0 UFC/g en muestras directas
- b) Menos de 10 UFC/g en muestras de dilución 1:10
- c) Menos de 100 UFC/g en muestras de dilución 1:100

5.9.10 Informe de la prueba

UFC de <i>Staphylococcus aureus</i> /g
--

6. Microorganismos patógenos y toxinas microbianas

6.1 Determinación de *Salmonella sp.*

6.1.1 Principio del método.

La presente técnica para la detección de *Salmonella sp.* en alimentos, describe un esquema general que consiste en cinco pasos:

- a) Preenriquecimiento, donde la muestra es enriquecida en un medio nutritivo no selectivo, el cual permite restaurar las células de *Salmonella* dañadas a una condición fisiológica estable.
- b) Enriquecimiento selectivo, empleado con el propósito de incrementar las poblaciones de *Salmonella* e inhibir otros organismos presentes en la muestra.
- c) Aislamiento en medios sólidos, donde se utilizan medios selectivos que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a *Salmonella* y permite el reconocimiento visual de colonias sospechosas.
- d) Identificación bioquímica, es la que permite la identificación de cultivos presuntivos de *Salmonella*.
- e) Serotipificación, la cual es una técnica serológica que permite la identificación específica de un cultivo.

6.1.2 Equipo.

6.1.2.1 Agitador magnético

6.1.2.2 Agitador tipo Vórtex

6.1.2.3 Balanza analítica, con una sensibilidad de 0,1 mg

6.1.2.4 Campana de flujo laminar (opcional)

6.1.2.5 Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 2^{\circ}\text{C}$, provista con termómetro calibrado o verificado

6.1.2.6 Microscopio compuesto

6.1.2.7 Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH

6.1.2.8 Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato o bien un homogeneizador peristáltico (stomacher).

6.1.3 Materiales.

6.1.3.1 Matraces Erlenmeyer de 500 mL.

6.1.3.2 Frascos de vidrio de boca ancha de 500 mL con tapa de rosca.

6.1.3.3 Cucharas, bisturíes, cuchillos y pinzas.

6.1.3.4 Tubos de ensayo de 16 X 150 mm.

6.1.3.5 Tubos de ensayo de 20 X 100 mm.

6.1.3.6 Pipetas bacteriológicas o graduadas de 1 y 10 mL (o si es necesario de 1 y 2 mL), con tapón de algodón y con divisiones de 0,1 mL.

6.1.3.7 Cajas de Petri.

6.1.3.8 Gradillas para tubos de ensayo.

6.1.3.9 Asas bacteriológicas.

6.1.3.10 Papel indicador de pH.

6.1.3.11 Mecheros Bunsen o Fisher.

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

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

a) Horno, durante 2 h a 170 a 175°C o 1 h a 180 a 185°C , o

b) Autoclave, durante 15 minutos como mínimo a $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

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

6.1.4 Reactivos

Todos los reactivos deben ser grado analítico, a menos que se indique otra especificación y para efectos de este método por agua se entiende agua destilada.

6.1.4.1 Solución de verde brillante al 1%

Disolver 1 g de verde brillante en agua destilada hasta completar 100 mL. Esterilizar por 15 min a $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

6.1.4.2 Solución de verde brillante al 0,1%

Disolver 0,1 g de verde brillante en agua destilada hasta completar 100 mL. Esterilizar por 15 min a $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

6.1.4.3 Solución de yodo-yoduro

Ingredientes	Cantidades
Cristales de yodo	6 g
Yoduro de potasio (KI)	5 g
Agua destilada	20 mL

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

6.1.4.4 Solución salina al 0,85%

Disolver 0,85 g de cloruro de sodio en 100 mL de agua y esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min.

6.1.4.5 Solución salina formalinizada

Ingredientes	Cantidades
Solución de formaldehído (36-38%)	6 mL
Cloruro de sodio (NaCl)	8,5 g
Agua destilada	1 L

Disolver 8,5 g de cloruro de sodio en 1 litro de agua destilada. Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min.

Enfriar a temperatura ambiente. Adicionar 6 mL de la solución de formaldehído. No esterilizar después de la adición de formaldehído.

6.1.4.6 Reactivo de Kovacs, como se señala en el numeral 5.6.4.1.

6.1.4.7 Reactivo de Voges-Proskauer, como se describe en el numeral 5.6.4.2.

6.1.4.8 Indicador rojo de metilo, como se indica en el numeral 5.6.4.3.

6.1.4.9 Solución de gelatinasa al 5%.

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

6.1.4.10 Tergitol aniónico 7.

6.1.4.11 Tritón X-100.

Es el nombre comercial del octilfenoxipolietoxietanol.

6.1.4.12 Antisueros

Antisuero polivalente somático (O)

Antisuero polivalente flagelar (H)

Antisuero Vi

6.1.4.13 Solución de cloro de 200 mg/kg conteniendo 0,1% de dodecilsulfato de sodio

Ingredientes	Cantidades
Solución de cloro para uso doméstico	8 mL
Agua destilada conteniendo dodecilsulfato de sodio	992 mL

Preparación:

Disolver 1 g de dodecilsulfato de sodio en 992 mL de agua destilada. Adicionar 8 mL de la solución de cloro para uso doméstico y mezclar bien. Preparar inmediatamente antes de su uso.

6.1.5 Medios de cultivo.

En caso de utilizar medio de cultivo deshidratado, seguir las instrucciones del fabricante.

6.1.5.1 Medios de preenriquecimiento

6.1.5.1.1 Regulador de agua peptonada

Ingredientes	Cantidades
Peptona	10 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Fosfato sódico dibásico (KH_2PO_4)	3,5 g
Fosfato potásico monobásico (K_2HPO_4)	1,5 g
Agua	1 L

pH final: $7,0 \pm 0,2$

Preparación:

Disolver los componentes en agua, calentando si es necesario. Ajustar el pH, si es necesario, después de la esterilización.

Distribuir en recipientes de vidrio esterilizables con la capacidad necesaria para obtener las porciones necesarias para la prueba. Esterilizar por 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

6.1.5.1.2 Caldo lactosado

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Lactosa	5 g
Agua destilada	1 L

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

Preparación:

Disolver los ingredientes en agua, calentando a 65°C . Distribuir en porciones de 225 mL, en frascos de 500 mL. Esterilizar durante 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

6.1.5.1.3 Caldo soya tripticaseína

Ingredientes	Cantidades
Triptona o tripticaseína	17 g
Fitona peptona	3 g
Glucosa	2,5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	2,5 g
Agua destilada	1 L

pH final: $7,3 \pm 0,2$

Preparación:

Disolver los ingredientes en 1 litro de agua destilada, calentando lentamente hasta su disolución completa.

Distribuir porciones de 225 mL en matraces de 500 mL y esterilizar en autoclave durante 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

6.1.5.1.4 Leche descremada reconstituida.

Suspender 100 g de leche descremada en polvo en un litro de agua destilada. Agitar hasta disolución. Distribuir volúmenes de 225 mL en matraces Erlenmeyer de 500 mL. Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 min.

6.1.5.1.5 Caldo soya tripticaseína estéril adicionado con sulfito de potasio.

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

6.1.5.1.6 Caldo de preenriquecimiento universal.

Ingredientes	Cantidades
Tristona	5 g
Proteosa peptona	5 g
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	15 g
Fosfato disódico (Na_2HPO_4)	7 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Dextrosa	0,5 g
Sulfato de magnesio (MgSO_4)	0,25 g
Citrato férrico amoniacal	0,1 g

Piruvato de sodio (C ₃ H ₃ NaO ₃)	0,2 g
Agua destilada	1 L

pH final 6,3 ± 0,2.

Preparación:

Calentar con agitación vigorosa para disolver todos los ingredientes. Distribuir volúmenes de 225 mL en matraces Erlenmeyer de 500 mL. Esterilizar a 121 ± 1°C durante 15 min.

6.1.5.1.7 Caldo soya tripticaseína con sulfato ferroso.

Ingredientes	Cantidades
Triptona o tripticaseína	17 g
Fitona peptona	3 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	2,5 g
Glucosa	2,5 g
Sulfato ferroso (FeSO ₄)	35 mg
Agua destilada	1 L

pH final 7,3 ± 0,2.

Preparación:

Calentar con agitación vigorosa para disolver todos los ingredientes. Distribuir 225 mL en matraces Erlenmeyer de 500 mL. Esterilizar a 121 ± 1°C durante 15 min.

6.1.5.2 Medios de enriquecimiento

6.1.5.2.1 Caldo selenito-cistina

Ingredientes	Cantidades
Triptona o polipeptona	5 g
Lactosa	4 g
Fosfato disódico (Na ₂ HPO ₄)	10 g
Selenito de sodio (Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O)	4 g
L-cistina	0,01 g
Agua destilada	1 L

pH final: 7,0 ± 0,2

Preparación:

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada estéril y distribuir en volúmenes de 10 y 225 mL en recipientes estériles, según se requiera.

El caldo así preparado es transparente. De preferencia usarlo el mismo día de su preparación. Calentar a flujo de vapor durante 5 min, con lo cual se desarrolla un color salmón. NO ESTERILIZAR.

6.1.5.2.2 Caldo base tetratationato

Ingredientes	Cantidades
Proteosa peptona o triptona	5 g
Sales biliares	1 g
Carbonato de calcio (CaCO ₃)	10 g
Tiosulfato de sodio anhidro (Na ₂ S ₂ O ₃)	30 g
Agua destilada	1 L

pH final: 7,0 ± 0,1

Preparación:

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada mezclar y calentar a ebullición. Enfriar a 45°C. Distribuir, agitando constantemente, en porciones de 10 y 225 mL, en recipientes estériles. Guardar en refrigeración.

Antes de usar el medio, agregar 2 mL de una solución yodo-yoduro y 1 mL de solución de verde brillante al 0,1% por cada 100 mL de caldo. El medio una vez adicionado de yodo no debe calentarse y debe usarse el mismo día de su preparación.

6.1.5.2.3 Medio Rappaport- Vassiliadis

Caldo base

Ingredientes	Cantidades
Tristona	5 g
Cloruro de sodio(NaCl)	8 g
Fosfato dihidrogenado de potasio (KH ₂ PO ₄)	1 g
Agua destilada	1 L

Disolver los componentes en agua por calentamiento cercano a 70°C. Preparar el día de su uso.

Solución de cloruro de magnesio

Ingredientes	Cantidades
Cloruro de magnesio (MgCl ₂ .6H ₂ O)	400 g
Agua destilada	1 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 color ámbar a temperatura ambiente.

Solución de oxalato de verde de malaquita

Ingredientes	Cantidades
Oxalato de verde de malaquita	0,4 g
Agua destilada	100 mL

pH final: 5,5 ± 0,2

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

Mezclar 1 L de caldo base, 100 mL de la solución de cloruro de magnesio y 10 mL de la solución de oxalato de verde de malaquita.

Distribuir volúmenes de 10 mL en tubos de 16 X 150 mm. Esterilizar a 121 ± 1°C durante 15 min. Almacenar en refrigeración.

6.1.5.3 Medios selectivos

6.1.5.3.1 Agar con sulfito de bismuto

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne de res	5 g
Polipeptona o peptona	10 g
Dextrosa	5 g
Fosfato disódico (Na ₂ HPO ₄)	4 g
Sulfato ferroso anhidro (FeSO ₄)	0,3 g
Sulfito de bismuto (BiSO ₃)	8 g
Verde brillante	0,025 g
Agar	20 g

Agua destilada 1 L

pH final: $7,7 \pm 0,2$

Preparación:

Suspender los ingredientes en un litro de agua. Calentar hasta su disolución completa, agitando frecuentemente. Ajustar el pH.

Enfriar a 45°C y verter en cajas de Petri estériles, distribuyendo de manera homogénea el precipitado propio del medio.

El aspecto de las placas es opaco, de color verde pálido y deben usarse el mismo día de su preparación. Si la coloración es parda, no deben utilizarse.

El medio no debe esterilizarse en autoclave; el sobrecalentamiento afecta su selectividad.

6.1.5.3.2 Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)

Ingredientes	Cantidades
Xilosa	3,75 g
L-lisina	5 g
Lactosa	7,5 g
Sacarosa	7,5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Extracto de levadura	3 g
Rojo de fenol	0,08 g
Agar	15 g
Desoxicolato de sodio ($\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}_4$)	2,5 g
Citrato férrico amoniacal	0,8 g
Tiosulfato de sodio anhidro ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	6,8 g
Agua destilada	1 L

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

Preparación:

Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada, y calentar en baño de agua a 55°C agitando frecuentemente hasta disolución completa. Ajustar el pH. Enfriar a 50°C y verter en cajas de Petri estériles. No esterilizar.

El sobrecalentamiento produce una precipitación y 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.

6.1.5.3.3 Agar entérico Hektoen

Ingredientes	Cantidades
Proteosa peptona	12 g
Extracto de levadura	3 g
Lactosa	12 g
Sacarosa	12 g
Salicina	2 g
Sales biliares	9 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Tiosulfato de sodio anhidro ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	5 g
Citrato férrico amoniacal	1,5 g

Azul de bromotimol	0,065 g
Fuscina ácida	0,1 g
Agar	14 g
Agua	1 L

pH final: $7,5 \pm 0,2$

Preparación:

Suspender los ingredientes en agua destilada. Hervir con agitación hasta completar disolución del agar. No sobrecalentar.

Dejar enfriar a $55 - 60^{\circ}\text{C}$ y distribuir en cajas de Petri estériles en condiciones asépticas.

6.1.5.4 Medio para pruebas bioquímicas

6.1.5.4.1 Agar de tres azúcares y hierro (TSI)

Ingredientes	Cantidades
Polipeptona	20 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Lactosa	10 g
Sacarosa	10 g
Glucosa	1 g
Agar	13 g
Rojo de fenol	25 mg
Sulfato ferroso amónico pentahidratado	200 mg
Tiosulfato de sodio anhidro ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	200 mg
Agua destilada	1 L

pH final: $7,3 \pm 0,2$

Preparación:

Suspender los ingredientes en 1 L de agua destilada. Calentar a ebullición, agitando ocasionalmente, hasta disolución completa. Enfriar a 60°C y ajustar el pH.

Distribuir volúmenes de 3 mL en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar a $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 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.

6.1.5.4.2 Agar de hierro y lisina (LIA)

Ingredientes	Cantidades
Peptona de gelatina	5 g
Extracto de levadura	3 g
Glucosa	1 g
Clorhidrato de L-lisina	1 g
Citrato férrico amoniacal	500 mg
Tiosulfato de sodio anhidro ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	40 mg
Púrpura de bromocresol	20 mg
Agar	150 g
Agua destilada	1 L

pH final: $6,7 \pm 0,2$

Preparación:

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

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

6.1.5.4.3 Agar nutritivo

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L

pH final: $6,8 \pm 0,2$

Preparación:

Suspender los ingredientes en agua. Dejar reposar de 5 a 10 min. Calentar a ebullición hasta disolución completa. Distribuir en tubos de 13 x 100 mm, en cantidades de 1/3 de su volumen.

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

6.1.5.4.4 Medio de SIM (para Sulfhídrico, Indol y Movilidad)

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne	3 g
Peptona	30 g
Hierro peptonizado	0,2 g
Tiosulfato de sodio anhidro ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	0,025 g
Agua destilada	1 L

pH final: $7,3 \pm 0,2$

Preparación:

Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta lograr una disolución completa. Enfríar a 50°C y ajustar el pH.

Distribuir volúmenes de 3 mL en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min. Se dejan enfriar los tubos en posición vertical.

6.1.5.4.5 Agar citrato de Simmons

Ingredientes	Cantidades
Fosfato de amonio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)	1 g
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	1 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Citrato de sodio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2 g
Sulfato de magnesio (MgSO_4)	0,2 g
Azul de bromotimol	0,08 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L

pH final: $6,8 \pm 0,2$

Preparación:

Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta lograr una disolución completa. Ajustar el pH.

Distribuir volúmenes de 3 mL en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min. Dejar enfriar los tubos en posición inclinada.

6.1.5.4.6 Caldo MR-VP (Rojo de metilo-Voges Proskauer)

Ingredientes	Cantidades
Peptona tamponada	7 g
Glucosa	5 g
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	5 g
Agua destilada	1 L

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

Preparación:

Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar a ebullición, agitar frecuentemente hasta lograr una disolución completa. Ajustar el pH.

Distribuir volúmenes de 3 mL en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min.

6.1.5.4.7 Caldo manitol

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne	1 g
Proteosa peptona	10 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Rojo de fenol	0,018 g
Manitol	10 g
Agua	1 L

pH final: $7,4 \pm 0,2$

Preparación:

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

6.1.5.4.8 Caldo malonato.

Ingredientes	Cantidades
Extracto de levadura	1 g
Sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	2 g
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	0,6 g
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	0,4 g
Cloruro de sodio (NaCl)	2 g
Malonato de sodio ($\text{C}_3\text{H}_2\text{Na}_2\text{O}_4$)	3 g
Glucosa	0,25 g
Azul de bromotimol	0,025 g
Agua	1 L

pH final: $6,7 \pm 0,2$

Preparación:

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

6.1.5.4.9 Caldo Urea

Ingredientes	Cantidades
Urea	20 g
Extracto de levadura	0,1 g
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	9,1 g
Fosfato disódico (Na_2HPO_4)	9,5 g
Rojo de fenol	0,01 g
Agua	1 L

pH final: $6,8 \pm 0,2$

Preparación:

Disolver los ingredientes en agua destilada. No calentar.

Esterilizar por filtración a través de membrana de $0,45 \mu m$. Distribuir asépticamente volúmenes de 1,5 a 3 mL en tubos de 13 x 100 mm estériles.

6.1.5.4.10 Caldo de urea rápido

Ingredientes	Cantidades
Urea	20 g
Extracto de levadura	0,1 g
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	0,091 g
Fosfato disódico (Na_2HPO_4)	0,095 g
Rojo de fenol	0,01 g
Agua	1 L

pH final: $6,8 \pm 0,2$

Preparación:

Disolver los ingredientes en agua destilada. No calentar. Esterilizar por filtración a través de membrana $0,45 \mu m$.

Distribuir asépticamente volúmenes de 1,5 a 3 mL en tubos de 13 x 100 mm estériles.

6.1.5.4.11 Caldo infusión cerebro corazón, como se señala en el numeral 5.9.5.4.

6.1.6 Preparación de la muestra.

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 debe utilizar una muestra de 25 g o más.

6.1.6.1 Procedimiento general.

6.1.6.1.1 Pesar asépticamente 25 g de la muestra y homogeneizarla 1 min, en licuadora, en homogeneizador peristáltico (stomacher) o manualmente si la muestra lo permite. Adicionar 225 mL del medio de preenriquecimiento estéril (generalmente caldo lactosado, a menos que se indique otro), dejar reposar por 60 ± 5 min a temperatura ambiente. Ajustar si es necesario, a un pH de $6,8 \pm 0,2$ con hidróxido de sodio 1N o ácido clorhídrico 1N estériles.

6.1.6.1.2 Incubar a $35 \pm 2^\circ C$ durante 24 ± 2 h. Continuar como se describe en el numeral 6.1.7.

6.1.6.2 Clara, yema y huevo entero en polvo, fórmulas infantiles y mezclas preparadas en polvo (harinas para hot cakes, galletas, donas, bisquets y pan).

Pesar 25 g de muestra analítica en el medio de preenriquecimiento, dejando que el polvo se humecte lentamente. Si es necesario homogeneizar poco a poco con una varilla de vidrio estéril u otra herramienta también estéril. Continuar conforme a lo establecido en el numeral 6.1.6.1.

6.1.6.3 Productos congelados de huevo no pasteurizados.

Descongelar la muestra a $45^\circ C$ por 15 min aproximadamente con agitación constante en un baño de agua o por 18 h a una temperatura entre $2-5^\circ C$. Pesar asépticamente y por duplicado 25 g de muestra. Colocar en

un matraz con 225 mL de medio Rappaport Vassiliadis una de las muestras y la otra en un matraz con 225 mL de caldo base tetrionato. Proceder como en 6.1.6.1 hasta ajustar el pH. Adicionar 2,25 mL de verde brillante al 0,1% y 4,5 mL de solución yodo-yoduro a la muestra contenida en el caldo base tetrionato y mezclar bien. Incubar como se indica en el numeral 6.1.7.2.

6.1.6.4 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.

De preferencia no descongelar la muestra antes de su análisis, si esto es necesario, proceder conforme a lo establecido en el numeral 6.1.6.3 utilizando caldo lactosado como medio de preenriquecimiento y homogeneizar durante 2 min. Continuar después de la incubación como se describe en el numeral 6.1.7.

6.1.6.5 Leche en polvo, entera, semidescremada o descremada.

Seguir el procedimiento general para el pesado de la muestra y adicionarla lentamente a un matraz Erlenmeyer con 225 mL de solución verde brillante al 0,1%, procurando que el polvo quede en la superficie del líquido y se hidrate lentamente. Dejar la mezcla en reposo por 60 min, e incubar como se indica en el numeral 6.1.6.1.2.

6.1.6.6 Queso.

Proceder conforme a lo establecido en el numeral 6.1.6.1 pero utilizando regulador de agua peptonada como medio de preenriquecimiento.

6.1.6.7 Caseína.

Seguir el procedimiento conforme a lo señalado en el numeral 6.1.6.1, homogeneizar por 2 min y ajustar cuidadosamente el pH.

6.1.6.8 Coco.

Proceder de conformidad con el numeral 6.1.6.1. Ajustar el pH si es necesario. Adicionar hasta un máximo de 2,25 mL de Tergitol aniónico 7 estéril ($121 \pm 1^\circ\text{C}/15$ min) y mezclar bien. Puede utilizarse Tritón X-100 estéril. Usar el volumen mínimo necesario de estos detergentes para que se inicie la formación de espuma. Puede ser, para el Tritón X-100 de dos a tres gotas. Incubar conforme a lo establecido en el numeral 6.1.6.1.2.

6.1.6.9 Levadura seca.

Seguir el procedimiento como se describe en el numeral 6.1.6.1, utilizando como medio de enriquecimiento caldo soya tripticaseína estéril. Mezclar para formar una suspensión homogénea. Ajustar el pH y terminar el procedimiento como se señala en el numeral 6.1.6.1.

Para levadura seca inactiva, continuar conforme a lo señalado en el numeral 6.1.7.1. Para levadura seca activa, mezclar la muestra incubada y transferir 1 mL a cada tubo conteniendo 10 mL de caldo base tetrionato y 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis. Incubar los medios selectivos por 24 ± 2 h. Continuar conforme a lo establecido en el numeral 6.1.7.2.

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

- a) Productos procesados térmicamente y productos secos. Seguir el procedimiento señalado en el numeral 6.1.6.1 hasta la homogeneización. Si la muestra es en polvo o molida, el licuado puede omitirse. Después de reposar, mezclar bien y ajustar el pH como se indica en el procedimiento general. Para emulsionar las grasas, agregar los detergentes en las mismas proporciones y con las mismas recomendaciones establecidas en el numeral 6.1.6.8. La cantidad de los mismos depende en gran medida de la composición del alimento. Los detergentes no son necesarios en los productos glandulares en polvo. Incubar las muestras como indica el numeral 6.1.6.1.2.
- b) Productos crudos o altamente contaminados. Pesar 2 porciones de 25 g de producto en recipientes estériles. Adicionar a una porción 225 mL de caldo Rappaport Vassiliadis y a la otra porción 225 mL de caldo base tetrionato. Homogeneizar por 2 min y ajustar el pH como se establece el numeral 6.1.6.1.

Adicionar 2,25 mL de solución de verde brillante al 0,1% y 4,5 mL de solución yodo-yoduro a la muestra que se enriquece con caldo base tetrionato. Homogeneizar e incubar. Continuar conforme a lo señalado en el numeral 6.1.7.

6.1.6.11 Dulces y dulces cubiertos (incluyendo chocolate).

Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un vaso para licuadora y agregar 225 mL de leche descremada reconstituida. Homogeneizar por 2 min. Manejar de igual forma que lo señalado en el numeral 6.1.6.1 hasta después de ajustar el pH. Adicionar 0,45 mL de la solución verde brillante al 1% y mezclar bien. Incubar como indica el numeral 6.1.6.1.2.

6.1.6.12 Pimienta negra, pimienta blanca, semilla de apio, comino, perejil seco, romero, tomillo, chile en polvo, paprika o pimentón, ajonjolí, hojuelas de vegetales (vegetales secos).

Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un recipiente estéril el cual contiene 225 mL de caldo soya tripticaséina y mezclar completamente. Continuar conforme a lo establecido en el numeral 6.1.6.1.

6.1.6.13 Ajo en polvo u hojuelas; cebolla en polvo u hojuelas.

Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un recipiente estéril el cual contiene 225 mL de caldo soya tripticaséina adicionado con sulfito de potasio y mezclar completamente. Continuar conforme a lo establecido en el numeral 6.1.6.1.

6.1.6.14 Pimienta de Jamaica (Pimienta inglesa), clavo de especia, canela y orégano.

No se conoce un método para neutralizar la toxicidad de estas cuatro especias. Diluir por lo tanto, más allá de su poder de toxicidad. Examinar la pimienta, canela y orégano en una proporción 1:100 muestra/ caldo, y el clavo a 1: 1000 muestra/caldo. Seguir conforme a lo señalado en el numeral 6.1.6.12

6.1.6.15 Gelatina

Pesar asépticamente 25 g de muestra en un recipiente estéril el cual contiene 225 mL de caldo lactosado estéril con 5 mL de solución acuosa de gelatinasa al 5% y mezclar completamente. Dejar reposar 60 min y continuar conforme a lo establecido en el numeral 6.1.6.1.

6.1.6.16 Colorantes para alimentos.

Para colorantes con $\text{pH} \geq 6,0$ (suspensión acuosa al 10%), usar el método descrito en el numeral 6.1.6.2.

Para lacas de colorantes con $\text{pH} < 6,0$, pesar asépticamente 25 g de muestra en un frasco estéril. Adicionar 225 mL de caldo base tetrionato. Homogeneizar y dejar en reposo 60 ± 5 min a temperatura ambiente y preferentemente tapado. Ajustar el pH a $6,8 \pm 0,2$. Adicionar 2,25 mL de solución de verde brillante al 0,1% y mezclar completamente. Incubar a 24 ± 2 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Continuar conforme a lo señalado en el numeral 6.1.7.

6.1.6.17 Huevo en cascarón.

Lavar los huevos con un cepillo duro y enjuagar. Desinfectar los huevos en una solución de cloro de 200 mg/kg conteniendo 0,1% de dodecilsulfato de sodio. Romper los huevos asépticamente en un contenedor estéril y mezclar completamente con una cuchara estéril. Pesar asépticamente 25 g en un matraz Erlenmeyer de 500 mL estéril. Adicionar 225 mL de caldo soya tripticaséina suplementado con sulfato ferroso y mezclar por agitación. Dejar en reposo 60 ± 5 min a temperatura ambiente. Ajustar el pH si es necesario a $6,8 \pm 0,2$. Incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 24 ± 2 h. Continuar conforme a lo señalado en el numeral 6.1.7.

6.1.6.18 Goma guar.

Pesar asépticamente 25 g de muestra en un matraz de 250 mL estéril. Preparar una solución de celulasa al 1,0% (1 g de celulosa en 99 mL de agua destilada estéril). Colocar en botellas de 150 mL (la solución de celulasa puede ser almacenada a $2-5^\circ\text{C}$ por arriba de 2 semanas).

Adicionar 225 mL de caldo lactosado y 2,25 mL de solución de celulasa al 1% estéril en otro contenedor apropiado de 500 mL. Mientras se está agitando magnéticamente el caldo celulasa/lactosa verter la unidad de 25 g de muestra rápidamente a través de un embudo estéril al caldo. Tapar el contenedor y dejar en reposo 60 ± 5 min a temperatura ambiente. Incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 h sin ajustar el pH. Continuar como se señala en el numeral 6.1.7.

6.1.6.19 Jugo de naranja (pasteurizado y no pasteurizado).

Asépticamente adicionar 25 mL de muestra a 225 mL de caldo de preenriquecimiento universal en un contenedor de 500 mL con tapa. Agitar completamente. Tapar y dejar en reposo 60 ± 5 min a temperatura ambiente. No ajustar el pH. Incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 h. Continuar como se describe en el numeral 6.1.7.

6.1.6.20 Huevos líquidos enteros (homogeneizado).

Pesar 25 g en un matraz Erlenmeyer de 500 mL estéril. Adicionar 225 mL de caldo soya tripticaseína con sulfato ferroso y mezclar. Continuar conforme a lo establecido en el numeral 6.1.6.1.

6.1.7. Enriquecimiento selectivo de *Salmonella* sp.

6.1.7.1 Cerrar firmemente el tapón de rosca de los matraces con los cultivos de preenriquecimiento y agitar suavemente. Transferir respectivamente 1 mL de la mezcla a un tubo que contenga 10 mL de caldo base tetrionato y 0,1 mL a otro con 10 mL de medio Rappaport Vassiliadis. Mezclar vigorosamente en vórtex.

6.1.7.2 Incubar el medio Rappaport Vasiliadis y el caldo base tetrionato a $43 \pm 0,2$ °C, y solo para el caso de la goma guar incubar los caldos selenito cistina y tetrionato a 35 ± 2 °C durante 24 ± 2 h.

6.1.8 Aislamiento de *Salmonella* sp.

6.1.8.1 Mezclar el tubo con medio Rappaport Vasiliadis, caldo tetrionato o caldo selenito cistina (para el caso de goma guar) y estriar en agar xilosa lisina desoxicolato (XLD), agar sulfito de bismuto (SB) y agar entérico Hektoen (EH).

6.1.8.2 Efectuar el mismo procedimiento para el caldo base tetrionato.

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

6.1.8.4 Examinar las placas para investigar la presencia de colonias típicas de *Salmonella*, de acuerdo con las siguientes características:

- a) Agar XLD: colonias rosas o rojas que pueden ser transparentes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.
- b) Agar entérico Hektoen: colonias verdes o azulverdes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.
- c) 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.

6.1.9 Identificación bioquímica presuntiva.

6.1.9.1 Seleccionar al menos dos colonias típicas de cada medio selectivo, que se encuentren bien aisladas.

6.1.9.2 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.

6.1.9.3 Incubar a 35 ± 2 °C durante 24 ± 2 h.

6.1.9.4 Almacenar las placas con medios selectivos en refrigeración, por si es necesario probar más colonias.

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

- a) 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.
- b) 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.

6.1.9.6 Retener todos los cultivos que muestren las reacciones características de *Salmonella* en los medios TSI y LIA y efectuar las pruebas bioquímicas y serológicas correspondientes.

6.1.9.7 Los cultivos con TSI que no parecen de *Salmonella* pero que presentan reacciones típicas en LIA, deben trabajarse como cultivos presuntivos positivos, ya que en estos casos, el medio LIA permite detectar *S. arizonae* y cepas atípicas de *Salmonella* que utilicen lactosa o sacarosa. Descartar solamente los cultivos que muestren reacciones atípicas en ambos medios.

6.1.9.8 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.

6.1.9.9 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.

6.1.10 Prueba de ureasa

6.1.10.1 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 vire rosa mexicano de las reacciones positivas con el color del medio original. Incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 h.

6.1.10.2 Prueba de ureasa (rápida). Tomar dos asadas de crecimiento del cultivo presumiblemente positivo de cada tubo de medio TSI e inocular tubos de caldo urea (rápida). Incubar a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 2 h en baño de agua.

6.1.10.3 Descartar todos los cultivos que den ureasa positiva. Retener los cultivos que den la prueba negativa (sin cambio de color del medio).

6.1.11 Identificación sexológica.

La determinación de los tipos serológicos de *Salmonella* sólo aplica cuando las consideraciones epidemiológicas sean cruciales.

6.1.11.1 Prueba polivalente somática O.

6.1.11.1.1 Colocar con una asa, dos gotas separadas de solución salina estéril sobre un portaobjetos o en dos secciones de una placa para aglutinación. Suspender en cada una de las gotas, una porción del cultivo de 24 h desarrollado en medio TSI.

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

6.1.11.1.3 Agitar inclinando la lámina hacia atrás y hacia adelante durante aproximadamente un min. Observar bajo buena iluminación sobre un fondo oscuro.

6.1.11.1.4 Considerar cualquier grado de aglutinación como resultado positivo. Clasificar el resultado de la prueba como sigue:

- a) Prueba positiva.- Aglutinación en la mezcla de prueba. Sin aglutinación en la solución salina (control).
- b) Prueba negativa.- Sin aglutinación en la mezcla de prueba y en la solución salina (control).
- c) Prueba no específica.- Aglutinación en la mezcla de prueba y mezcla control. En este caso se debe continuar con las pruebas bioquímicas complementarias.

6.1.11.2 Pruebas de grupos somáticos O.

6.1.11.2.1 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).

6.1.11.2.2 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.

6.1.11.2.3 Si no se cuenta con los sueros grupo específicos, solicitar la tipificación de la cepa al Laboratorio de Enterobacterias del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos del Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica o al Laboratorio Nacional de Salud Pública de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.

6.1.11.3 Prueba serológica polivalente flagelar (H).

6.1.11.3.1 Inocular el crecimiento del tubo de TSI en agar infusión de cerebro corazón e incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 4 a 6 h hasta que se observe crecimiento (para ensayo en el mismo día), o bien, en caldo soya tripticaseína a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 h (para ensayo al día siguiente). Adicionar 2,5 mL de solución salina formalinizada a 5 mL de ambos cultivos.

6.1.11.3.2 Colocar 0,5 mL del antisuero polivalente flagelar (H) preparado en un tubo para serología (13 x 100 mm aproximadamente). Adicionar 0,5 mL del cultivo formalinizado. Preparar un control de solución

salina mezclando 0,5 mL de solución salina formalinizada con 0,5 mL del antígeno formalinizado. Incubar las mezclas en baño de agua a 48- 50°C.

6.1.11.3.3 Observar la aglutinación a intervalos de 15 min por espacio de 1 h. Clasificar el resultado de la prueba como sigue:

- a) Prueba positiva.- Aglutinación en la mezcla de prueba. Sin aglutinación en el control.
- b) Prueba negativa.- Sin aglutinación en la mezcla de prueba y en la mezcla control.
- c) Prueba no específica.- Aglutinación en la mezcla de prueba y en la mezcla control.

6.1.11.4 Pruebas bioquímicas complementarias.

6.1.11.4.1 Cuando las pruebas serológicas o bioquímicas iniciales, dan resultados atípicos o no concluyentes, 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*.

6.1.11.4.2 Interpretar los cambios en los medios inoculados conforme a lo siguiente:

a) Agar citrato de Simmons

Inocular por estría el tubo. Incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 96 ± 2 h.

Prueba positiva: crecimiento acompañado de un cambio de color de verde a azul.

Prueba negativa: color verde.

b) Medio SIM

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

- 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 Kovacs.

Prueba positiva: desarrollo de un anillo de color rojo. Leer antes de 10 min.

Prueba negativa: sin cambio de color.

c) Prueba de Voges-Proskauer (VP)

Inocular un tubo con caldo MR-VP. Incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 ± 2 h. Transferir a un tubo 1 mL del cultivo de 48 h. Adicionar 0,6 mL de solución de alfa naftol. Añadir 0,2 mL de solución de hidróxido de potasio al 40%.

Prueba positiva: desarrollo de color rojo ladrillo.

Prueba negativa: sin cambio de color

d) Prueba de rojo de metilo

Inocular un tubo adicional con caldo MR-VP e incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 3 a 5 días. Adicionar 5 gotas de solución de rojo de metilo.

Prueba positiva: desarrollo de color rojo

Prueba negativa: desarrollo de color amarillo

e) Caldo malonato

Inocular un tubo conteniendo el medio. Incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 ± 2 h

Prueba positiva: desarrollo de color azul

Prueba negativa: color verde

f) Caldo manitol

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

Prueba positiva: desarrollo de color amarillo

Prueba negativa: color rojo

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

6.1.12 Expresión de resultados.

Comparar los resultados obtenidos de acuerdo con los cuadros 1 y 2 para la identificación de los géneros de las bacterias investigadas.

Cuadro 1

Interpretación de reacciones bioquímicas y serológicas

Reacciones bioquímicas	Reacciones serológicas	Interpretación
Típicas	Antígeno O, Vi o H positivo	Cepas consideradas como <i>Salmonella</i>
	Todas las reacciones negativas	Puede ser <i>Salmonella</i>
Atípicas	No probada	
Atípicas	Antígeno O, Vi o H positivo	No debe ser considerada <i>Salmonella</i>
	Todas las reacciones negativas	

Cuadro 2

Reacciones bioquímicas y serológicas de *Salmonella*

Prueba o sustrato	Positivo	Negativo	Reacción
Glucosa (TSI)	Fondo amarillo	Fondo rojo	+
Lisina descarboxilasa (LIA)	Fondo púrpura	Fondo amarillo	+
H ₂ S (TSI y LIA)	Precipitado negro	Sin precipitado	+
Ureasa	Rosa mexicano	Rosa pálido	-
Caldo malonato	Azul	Verde	- ^c
Prueba de indol	Superficie color rojo	Superficie color amarillo	-
Prueba Voges-Proskauer	De rosa a rojo	No hay cambio de color	-
Prueba rojo de metilo	Rojo	Amarillo	
Citrato de Simmons	Crecimiento; color azul	Verde	v
Prueba del antígeno flagelar	Aglutinación	No hay aglutinación	+
Prueba del antígeno somático	Aglutinación	No hay aglutinación	+

v, variable.

^c La mayoría de los cultivos *S. arizonae* son positivos.

6.1.13 Informe de la prueba.

Presencia o ausencia de *Salmonella sp* en ____g o ____ mL de muestra.

6.2 Determinación de *Listeria monocytogenes*.

6.2.1 Principio del método

Se basa en el aislamiento y la diferenciación de especies de *Listeria spp*, principalmente por la fermentación de carbohidratos y la actividad hemolítica de los miembros de este género.

6.2.2. Equipo

6.2.2.1 Balanza analítica, con una sensibilidad de 0,1 mg

6.2.2.2 Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 2^{\circ}\text{C}$, provista con termómetro calibrado o verificado.

6.2.2.3 Microscopio compuesto.

6.2.2.4 Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH.

6.2.2.5 Campana de flujo laminar (opcional).

6.2.3. Materiales.

6.2.3.1 Material general

6.2.3.1.1 Matraces Erlenmeyer de 500 mL.

6.2.3.1.2 Frascos de vidrio de boca ancha de 500 mL con tapa de rosca.

6.2.3.1.3 Cucharas, bisturíes, cuchillos y pinzas.

6.2.3.1.4 Tubos de ensayo de 16 X 150 mm.

6.2.3.1.5 Tubos de 13 X 100 mm.

6.2.3.1.6 Pipetas bacteriológicas o graduadas de 1 y 10 mL (o si es necesario de 1 y 2 mL), con tapón de algodón y con divisiones de 0,1 mL.

6.2.3.1.7 Cajas de Petri.

6.2.3.1.8 Gradillas para tubos de ensayo.

6.2.3.1.9 Asas bacteriológicas.

6.2.3.1.10 Papel indicador de pH.

6.2.3.1.11 Mecheros Bunsen o Fisher.

6.2.3.1.12 Lámpara de luz blanca.

6.2.3.1.13 Portaobjetos escabado.

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

a) Horno, durante 2 h a 170 a 175°C o 1 h a 180 a 185°C o

b) Autoclave, durante 15 minutos como mínimo a $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

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

6.2.3.2 Material biológico.

Para la prueba de CAMP se emplean las siguientes cepas:

Staphylococcus aureus

ATCC 49444

NCTC 7428

ATCC 25923

CIP 5710

Rhodococcus equi

ATCC 6939

NCTC 1621

6.2.5 Reactivos.

Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y para efectos de este método por agua se entiende agua destilada.

- 6.2.5.1 Hidróxido de sodio (NaOH) 1 M.
- 6.2.5.2 Lactamato de glicil-glicina (anhídrido de glicina).
- 6.2.5.3 Regulador de fosfatos glicerinado con pH $9,0 \pm 0,2$.
- 6.2.5.4 Solución de peróxido de hidrógeno al 3%.
- 6.2.5.5 Solución salina fisiológica al 0,85% estéril.
- 6.2.5.6 Sueros comerciales para tipificación de *Listeria spp.*
- 6.2.5.7 Reactivos para Tinción de Gram, de conformidad con lo establecido en el numeral 5.6.4.4.
- 6.2.5.8 Reactivos para la determinación de nitritos

Reactivo de ácido sulfanílico

Ingredientes	Cantidad
Acido sulfanílico	1 g
Acido acético 5N	125 mL

Reactivo de N-(1-naftil) etilendiamina.

Ingredientes	Cantidad
Didrocloruro de N(-1-naftil) etilendiamina	0,25 g
Acido acético 5N	200 mL

Reactivo de alfa-naftol

Ingredientes	Cantidad
Alfa-naftol	1 g
Acido acético 5N	200 mL

6.2.5.9 Solución de sulfato de cadmio al 20%

Colocar granallas de zinc en solución de sulfato de cadmio al 20% de 4 a 6 h. Disolver el precipitado de cadmio, adicionando ácido clorhídrico 1N.

6.2.6 Medios de cultivo

En el caso de utilizar medio de cultivo deshidratado seguir las instrucciones del fabricante.

6.2.6.1 Caldo soya tripticaseína con 0,6% de extracto de levadura (CSTEL)

Ingredientes	Cantidad
Caldo soya tripticaseína	30 g
Extracto de levadura	6 g
Agua	1 L

pH final $7,3 \pm 0,2$.

Preparación:

Agitar hasta disolver los ingredientes. Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min.

6.2.6.2 Caldo de enriquecimiento para *Listeria* (LEB) pH $7,3 \pm 0,1$

Un litro de caldo soya tripticaseína con extracto de levadura (CSTEL) debe contener los siguientes suplementos:

Suplementos	Cantidad
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	1,35 g
Clorhidrato de acriflavina	10 mg
Fosfato disódico (Na_2HPO_4)	9,6 g
Acido nalidíxico (sal sódica)	40 mg

Cicloheximida	50 mg
Piruvato de sodio (C ₃ H ₃ NaO ₃)	11,1 mL
Solución al 10% (p/v) *	

* Utilizar solamente cuando se sospeche que las células de *Listeria* estén dañadas, conforme a lo establecido en el numeral 6.2.8.2.

Preparación:

Preparar los suplementos de acriflavina y nalidíxico a partir de una solución al 0,5% (p/v) con agua.

El suplemento de cicloheximida prepararlo como una solución al 1,0 % (p/v) en una solución al 40% (v/v) de etanol en agua.

Esterilizar los suplementos por filtración.

Agregar en condiciones asépticas los suplementos al medio CSTEEL previamente esterilizado, justo antes de su uso.

Para la preparación de un litro del medio CSTEEL se debe partir de las soluciones anteriores, agregando las siguientes cantidades:

2,0 mL de acriflavina, 8,0 mL de ácido nalidíxico y 5,1 mL de solución de cicloheximida.

Precaución: La cicloheximida es una sustancia química altamente tóxica, durante su manejo deben emplearse guantes, lentes de protección y lavarse las manos inmediatamente después de usarla.

6.2.6.3 Agar cloruro de litio feniletanol-moxalactam/esculina hierro (LPMe)

Ingredientes	Cantidad
Agar fenil etanol	35,5 g
Glicina anhidra	10 g
Cloruro de litio	5 g
Solución de moxalactam al 1% en amortiguador de fosfatos pH 6,0	2 mL
Esculina	1 g
Citrato férrico amoniacal	0,5 g
Agua	1 L

Esterilizar el medio (sin moxalactam) en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min. Enfriar a 48 a 50°C y agregar la solución de moxalactam previamente esterilizada por filtración.

Distribuir volúmenes de 12 a 15 mL del medio en cajas de Petri estériles. Las placas delgadas facilitan la observación de las colonias.

6.2.6.4 Medio Oxford (OXA)

Ingredientes	Cantidad
Base de agar Columbia	39 g
Esculina	1 g
Citrato férrico amoniacal	0,5 g
Cloruro de litio (LiCl)	15 g
Agua	1 L

Preparación:

Agregar los ingredientes a un litro de agua y llevar a ebullición hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min.

Enfriar el medio base a 50°C y en condiciones asépticas, agregar los suplementos.

Un litro de medio Oxford debe contener los siguientes suplementos:

Suplementos	Cantidad
Cicloheximida	400 mg
Sulfato de colistina	20 mg
Acriflavina	5 mg
Cefotetán	2 mg
Fosfomicina	10 mg

Disolver la cicloheximida, el sulfato de colestina, acriflavina, cefotetán y la fosfomicina en 10 mL de una mezcla de etanol: agua 1:1. Esterilizar por filtración antes de agregar al medio base. Mezclar y vaciar en cajas de Petri estériles.

Las placas del medio Oxford se pueden almacenar como máximo dos semanas.

6.2.6.5 Agar soya tripticaseína con 0,6%, de extracto de levadura (ASTEL)

Ingredientes	Cantidad
Agar soya tripticaseína	40 g
Extracto de levadura	6 g
Agua	1 L

pH final 7,3 ± 0,2.

Preparación:

Agitar y calentar a ebullición hasta disolver el agar. Esterilizar a 121 ± 1°C durante 15 min.

6.2.6.6 Agar sangre de carnero

Ingredientes	Cantidades
Base de agar sangre	95 mL
Sangre de carnero desfibrinada	5 mL

Preparación:

Preparar el agar base de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Enfriar a 45 ± 2°C y agregar asépticamente la sangre de carnero, la cual previamente se debe encontrar a temperatura ambiente. Homogeneizar el medio y verter en cajas de Petri estériles de 12 a 15 mL para la prueba de CAMP y de 15 a 20 mL para la prueba de hemólisis.

6.2.6.7 Caldo nitratos

Ingredientes	Cantidades
Nitrato de potasio (KNO ₃)	1 g
Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Agua	1 L

pH final 7,0 ± 0,2.

Preparación:

Agregar los ingredientes a un litro de agua, agitar hasta disolución completa. Verter en tubos de 13 x 100 mm con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave a 121 ± 1°C durante 15 min.

6.2.6.8 Medio de SIM

Ingredientes	Cantidades
Peptona de caseína (casitone)	20 g
Peptona de carne	6,1 g

Sulfato de amonio ferroso	0,2 g
Tiosulfato de sodio anhidro (Na ₂ S ₂ O ₃)	0,2 g
Agar	3,5 g
Agua	1 L

pH final 7,3 ± 0,2.

Preparación:

Agitar y calentar a ebullición hasta disolver el agar. Distribuir porciones de 4 mL en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar en autoclave a 121 ± 1°C durante 15 min.

6.2.6.9 Medio prueba de movilidad (MTM)

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne	3 g
Peptona	10 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Agar	4 g
Agua	1 L

pH final 7,4 ± 0,2.

Preparación:

Agitar y calentar a ebullición hasta disolver el agar. Envasar en porciones de 4 mL en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar en autoclave a 121 ± 1°C durante 15 min.

6.2.6.10 Caldo púrpura para fermentación de carbohidratos

Ingredientes	Cantidades
Proteosa peptona No. 3	10 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Extracto de carne	1 g
Púrpura de bromocresol	0,02 g
Agua	1 L

pH final 6,8 ± 0,2.

Preparación:

Calentar si es necesario para disolver los ingredientes. Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121 ± 1°C.

Agregar la solución del carbohidrato previamente esterilizada por filtración en cantidad suficiente para obtener una concentración final de 0,5%.

6.2.6.11 Agar PALCAM selectivo para *Listeria*.

Medio base

Ingredientes	Cantidades
Peptona	23 g
Almidón	1 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Agar Columbia	13 g
Manitol	10 g
Citrato férrico amoniacal	0,5 g
Esculina	0,8 g
Dextrosa (glucosa)	0,5 g

Cloruro de litio (LiCl)	15,0 g
Rojo de fenol	0,08 g
Agua destilada	1 L

Agentes selectivos

Sulfato de polimixina B	10 mg
Acriflavina	5 mg
Ceftazidina	20 mg
Agua destilada	2 mL

pH final 7,2 ± 0,1.

Preparación:

Pesar 34,4 g del medio basal (todos los ingredientes excepto los tres agentes selectivos) y disolver en 500 mL de agua destilada. Esterilizar a 121 ± 1 °C por 15 minutos. Disolver los agentes selectivos en agua destilada estéril a 17,5 mg/L y esterilizar por filtración. Adicionar 1 mL de la solución de agentes selectivos a 500 mL de medio base estéril el cual ha sido enfriado a 50 °C. Mezclar y vaciar en cajas de Petri.

6.2.7 Precauciones generales

Esta técnica por ningún motivo debe aplicarla personal inmunocomprometido ya sea por enfermedad o por el uso de medicamentos, mujeres embarazadas o personas de edad avanzada.

6.2.8 Enriquecimiento

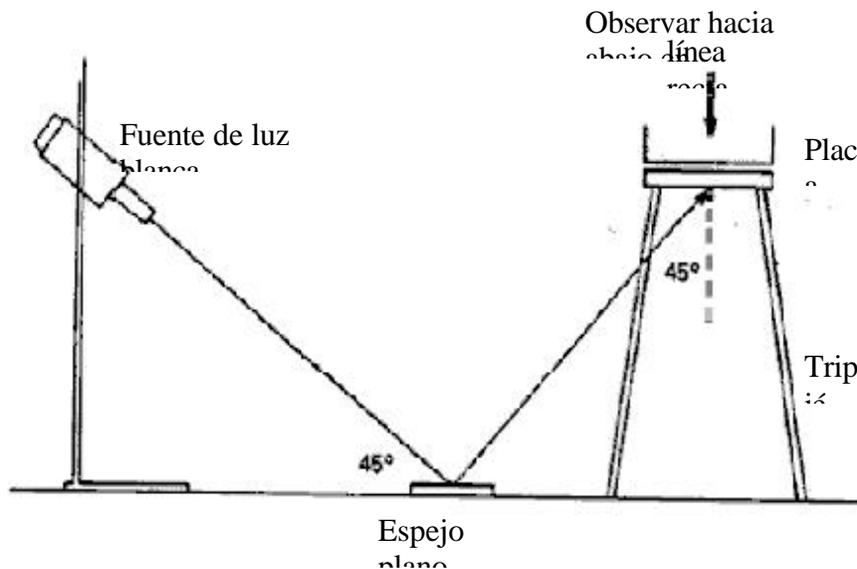
6.2.8.1 Adicionar 25 mL o 25 g de la muestra a 225 mL de medio de enriquecimiento (LEB) sin los agentes selectivos en un vaso de licuadora o stomacher. Homogeneizar. Transferir la mezcla a un matraz Erlenmeyer de 500 mL estéril e incubar a 30°C por 4 h. Adicionar los agentes selectivos, acriflavina, ácido nalidíxico, y cicloheximida y continuar la incubación otras 44 h, para un total de 2 días a 30 °C.

6.2.8.2 En el caso de muestras donde se sospecha que se tienen células de *Listeria spp* dañadas, inocular en un caldo de enriquecimiento que contenga piruvato de sodio al 0,1% (p/v). incubar a 30°C por 6 h sin suplementos. Después de 6 h de incubación, agregar los suplementos y continuar la incubación a 30°C hasta un total de 48 h.

6.2.9 Aislamiento

6.2.9.1 Después de 24 y 48 h de incubación en el medio EB, resembrar en los medios LMPe y OXA. Puede emplearse el agar PALCAM en sustitución del LPMe. Incubar las placas del medio LMP a 30°C por 24 a 48 h y las de medio OXA y PALCAM a 35°C por el mismo periodo.

6.2.9.2 Observar el crecimiento en las placas del medio LMP con luz blanca en un ángulo de 45° (iluminación de Henry), a simple vista o con la ayuda de una lupa. En este medio generalmente aparecen las colonias de color blanco o azul iridiscentes. Ver la figura 1.



Fi . 1. Diagrama de **Hen**
iluminación de

6.2.9.3 En el medio OXA las colonias de *Listeria* son negras, con halo negro. Algunas colonias pueden aparecer con un tono café oscuro que se define mejor a los siete días de incubación. *Listeria* se comporta de manera similar en OXA y PALCAM.

6.2.9.4 Seleccionar cinco o más colonias típicas del medio de OXA y LMPe o PALCAM y pasar a placas de medio ASTEL. Este paso es importante debido a que las colonias aparentemente aisladas en los medios OXA, LMPe y PALCAM, pueden estar contaminadas con flora competitiva parcialmente inhibida e imperceptible a simple vista.

6.2.9.5 Debido a que puede estar presente más de una especie de *Listeria* en la muestra, se deben identificar como mínimo cinco colonias.

6.2.9.6 Incubar las placas de ASTEL a 30°C por 24-48 h. Las placas pueden ser incubadas a 35°C si las colonias no se utilizan para la prueba de movilidad en fresco. Estos cultivos pueden mantenerse a 4°C y utilizarse como inóculo para realizar las pruebas de identificación.

6.2.10 Identificación

Examinar colonias típicas en el medio ASTEL. Con el sistema de iluminación de Henry, las colonias aparecen de color azul-gris a azul.

Se deben utilizar cepas de referencia positivas y negativas para cada una de las pruebas.

6.2.10.1 Prueba de movilidad en fresco

Hacer preparaciones en fresco (en gota suspendida o entre porta y cubreobjetos) utilizando solución salina al 0,85%. La suspensión debe ser densa y emulsificarse completamente. Observar en un microscopio de contraste de fase o microscopio compuesto utilizando el objetivo de inmersión. Las células de *Listeria spp* son bacilos cortos con movilidad rotatoria o como si brincaran. Los bacilos con movimientos rápidos no son *Listeria spp*. Comparar contra las cepas de referencia.

6.2.10.2 Prueba de catalasa

Emulsificar un cultivo puro, con una gota de solución de peróxido al 3%. La formación inmediata de burbujas indica que la prueba es positiva. Las especies de *Listeria* son catalasa positivo. La emulsión debe realizarse con una asa de plástico o palillo de madera estéril evitando el contacto del metal con el reactivo. Las colonias no deben provenir de agar base con sangre, cualquier contaminación con eritrocitos puede producir resultados falsos positivos.

6.2.10.3 Tinción de Gram

Hacer una tinción de Gram de cultivos de 16 a 24 h. Todas las especies de *Listeria* son bacilos cortos Gram positivo, los frotos teñidos pueden observarse en células individuales, cadenas cortas y formando empalizada y con arreglos en forma de "V" o "Y". Sin embargo, en cultivos viejos pueden presentarse como formas cocoides. En extensiones delgadas se observan de color pálido y pueden confundirse con *Bacteroides spp*.

6.2.10.4 Prueba de hemólisis

Dibujar una cuadrícula de 20 a 25 espacios en el fondo de la placa de agar sangre de carnero al 5%. Inocular por picadura un cuadro por cada cultivo. Incubar a 35 ± 2°C por 48 ± 2 h. Al inocular observar la reacción hemolítica en las placas. *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* producen una zona ligeramente clara alrededor del punto de picadura. Confirmar las reacciones dudosas, con la prueba de CAMP.

6.2.10.5 Prueba de reducción de nitratos

6.2.10.5.1 Inocular los tubos conteniendo caldo nitratos e incubar a 35 ± 2°C por 5 días. Para efectuar la lectura agregar 0,2 mL del reactivo A y 0,2 mL del reactivo B. La aparición de un color rojo indica una prueba positiva (presencia de nitritos). Si esta coloración no se observa, adicionar zinc en polvo. El desarrollo de color rojo después de una hora confirma una prueba negativa (presencia de nitratos). Si al cabo de este tiempo no hay coloración roja se considera una prueba positiva.

6.2.10.5.2 En forma alternativa adicionar al cultivo en caldo nitratos, 0,2 mL del reactivo B y 0,2 mL del reactivo C. El desarrollo de un color naranja indica una prueba positiva (presencia de nitritos). Si esta coloración no se observa, adicionar 0,2 mL del reactivo de cadmio. El desarrollo de un color naranja confirma una prueba negativa (presencia de nitratos). Si no hay coloración naranja se considera una prueba positiva.

6.2.10.6 Prueba de movilidad en agar

Inocular el medio SIM o MTM a partir del medio ASTEL. Incubar por 7 días a 20–25°C. Observar diariamente. Las especies de *Listeria* son móviles dando un crecimiento típico en forma de paraguas.

6.2.10.7 Prueba de utilización de carbohidratos

A partir del medio ASTEL inocular tubos de caldo púrpura para fermentación de carbohidratos al 0,5% : dextrosa, esculina, maltosa, ramnosa, manitol y xilosa. Incubar 7 días a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Una coloración amarilla indica una prueba positiva. Todas las especies de *Listeria* dan positivas las pruebas para dextrosa, esculina y maltosa. Consultar el cuadro 1 para reacciones con ramnosa, xilosa y manitol. Si la pigmentación prematura del aislamiento en el medio OXA no deja lugar a duda, el ensayo de esculina puede omitirse.

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

6.2.10.8 Prueba de Cristie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP)

6.2.10.8.1 Las cepas empleadas en la prueba de CAMP pueden obtenerse de diversas colecciones nacionales e internacionales.

6.2.10.8.2 En una placa de agar sangre de carnero, sembrar una estría de la cepa de *S. aureus* y paralelamente una de *R. equi*, separadas lo suficiente (aproximadamente 5 mm) para que entre éstas, se puedan estriar perpendicularmente las cepas sospechosas de *Listeria*, sin que lleguen a tocarse. Después de 24 y 48 h de incubación a 35°C observar el sinergismo entre las hemolisinas de *S. aureus*, *R. equi* y *Listeria* el cual se manifiesta como una zona hemolítica más intensa (punta de flecha).

6.2.10.8.3 La figura 2 muestra la disposición de las estrías de los cultivos en una placa para la prueba de CAMP. La hemólisis de *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* se incrementa cerca de la estría de *S. aureus* y la hemólisis de *L. ivanovii* se aumenta cerca de la estría de *R. equi*. Las especies restantes no son hemolíticas en esta prueba.

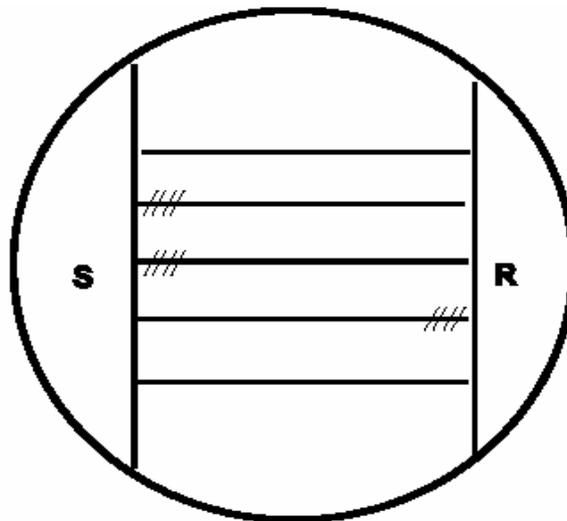


Fig. 2. Prueba de CAMP para *Listeria monocytogenes*. Las líneas horizontales representan las estrías de la inoculación de cinco cepas. Las líneas verticales representan las estrías de inoculación de *S. aureus* (S) y *R. equi* (R). Las líneas sombreadas indican el incremento de hemólisis en esas regiones

6.2.10.9 Serología

La determinación de los tipos serológicos de *Listeria* se aplica cuando las consideraciones epidemiológicas sean cruciales.

Inocular en caldo de triptosa a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 h. Transferir a dos tubos de agar inclinado de triptosa e incubar $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 h. Para realizar la prueba se pueden utilizar sueros comerciales específicos para *Listeria monocytogenes*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.2.11 Expresión de resultados

Comparar los resultados obtenidos de acuerdo con los cuadros 1 y 2. Determinar el género y especie de las cepas aisladas. El único miembro del género *Listeria* de importancia para esta norma es *Listeria monocytogenes*.

Cuadro 1. Diferenciación de las Especies de *Listeria*

Especies	β -hemólisis	Reducción nitratos	Fermentación de carbohidratos			CAMP	
			Manitol	Ramnosa	Xilosa	S.a.	R.e.
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	-	+	-	+	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	-	-	+	-	+
<i>L. innocua</i>	-	-	-	^b V	-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	^b V	+	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	-	+	¹ +	-
<i>L. grayi</i>	-	^b V	+	^b V	-	-	-

^a Sangre de carnero desfibrinada

^bV Variable

^c *L. grayi* incluye ahora las cepas de la especie *L. murrayi* reductoras de nitratos y ramnosa variable

S.a *Staphylococcus aureus*

R.e *Rhodococcus equi*

¹ Puede haber reacciones débilmente positivas, particularmente a las 48 horas de incubación.

Cuadro 2. Serología de las especies de *Listeria*

Especies	Serotipo
<i>L. monocytogenes</i>	1/2A, 1/2B, 1/2C 3A, 3B, 3C 4A, 4AB, 4B 4C, 4D, 4E, "7"
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. innocua</i>	4AB, 6A, 6B, Un ^a
<i>L. welshimeri</i>	6A, 6B
<i>L. seeligeri</i>	1/2B, 4C, 4D, 6B, Un ^a

^a Indefinido

6.2.12 Informe de la prueba

Presencia o ausencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en 25 g o 25 mL de muestra.

6.3 Determinación de *Vibrio cholerae* O:1

6.3.1 Principio del método

La recuperación de *V. cholerae* se basa en la selección de colonias típicas en agar para aislamiento. Algunas especies de microflora de competencia tienen apariencia similar a *V. cholerae* en medio de aislamiento. La habilidad de casi todas las cepas de *V. cholerae* para desarrollarse a 35 y 42°C, así como en un pH mayor a 8,3 las distingue de otras especies bacterianas asociadas.

6.3.2 Equipo.

6.3.2.1 Balanza analítica, con una sensibilidad de 0,1 mg.

6.3.2.2 Campana de flujo laminar (opcional).

6.3.2.3 Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 2^{\circ}\text{C}$, provista con termómetro calibrado o verificado.

6.3.2.4 Microscopio compuesto.

6.3.2.5 Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH.

6.3.2.6 Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato o bien un homogeneizador peristáltico (stomacher).

6.3.2.7 Baño de agua a una temperatura de $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

6.3.2.8 Equipo de filtración.

6.3.3 Materiales

6.3.1.1 Asas bacteriológicas.

6.3.2.2 Cajas de Petri.

6.3.3.3 Cubreobjetos.

6.3.3.4 Frascos de vidrio de boca ancha tipo tarro de 500 mL con tapa de rosca.

6.3.3.5 Matraces Erlenmeyer de 500 mL.

6.3.3.5 Membranas de filtración con un tamaño de poro de $0,45 \mu\text{m}$.

6.3.3.8 Mecheros de Bunsen o Fisher.

6.3.3.9 Papel indicador de pH.

6.3.3.10 Pipetas de 1 mL con graduaciones de 0,01 mL.

6.3.3.11 Pipetas de 5 mL con graduaciones de 0,1 mL.

6.3.3.12 Propipeta o bulbo.

6.3.3.13 Tubos de ensayo de 13 x 100 mm u otros con tapón de rosca.

6.3.3.14 Tubos de ensayo de 16 x 150 mm y 20 x 150 mm con tapón de rosca.

6.3.3.15 Tubos para pruebas bioquímicas de 10 x 75 mm o 13 x 100 mm.

6.3.3.16 Tubos para serología de 10 x 75 mm o de 13 x 100 mm.

6.3.4 Reactivos

Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y para efectos de este método por agua se entiende agua destilada.

6.3.4.1 Reactivos de Voges-Proskauer (VP), conforme a lo establecido en el numeral 5.6.4.2.

6.3.4.2 Reactivo para la prueba de oxidasa.

Ingredientes	Cantidades
N,N,N,N-tetrametil-p-fenilendiamino	0,5 g
Agua destilada	100 mL

Conservar en frasco color ámbar a $5-10^{\circ}\text{C}$. El reactivo se conserva durante 14 días.

6.3.4.3 Reactivo de Kovacs, como se indica en el numeral 5.6.4.1.

6.3.4.4 Antisuero polivalente (O) para *V. cholerae*

6.3.4.5 Antisueros somáticos individuales (O) para *V. cholerae*. Contiene aglutininas para antígenos (O) Inaba y Ogawa.

6.3.4.6 Aceite mineral estéril. Esterilizar a $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 30 min.

6.3.4.7 L-arginina

6.3.4.8 L-lisina

6.3.4.9 L-ornitina

6.3.4.10 Tiras comerciales para pruebas bioquímicas de *V. cholerae*.

6.3.4.11 Paquete para la detección de enterotoxina de *V. cholerae*.

6.3.5 Medios de cultivo

En el caso de utilizar medio de cultivo deshidratado seguir las instrucciones del fabricante.

6.3.5.1 Agua Peptonada Alcalina (APW)

Ingredientes	Cantidades
Peptona	10 g
Cloruro de sodio (NaCl)	10 g
Agua destilada	1 L

pH final $8,5 \pm 0,2$.

Preparación:

Disolver los ingredientes. Ajustar el pH. Esterilizar en autoclave 15 minutos a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

6.3.5.2 Agar Tiosulfato, Citrato, Sales Biliares y Sacarosa (TCBS)

Ingredientes	Cantidades
Extracto de levadura	5 g
Peptona	10 g
Sacarosa	20 g
Tiosulfato de sodio anhidro ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	10 g
Citrato de sodio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	10 g
Colato de sodio	3 g
Sales biliares	5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	10 g
Citrato férrico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe} \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1 g
Azul de bromotimol	40 mg
Azul de timol	40 mg
Agar	15 g
Agua destilada	1 L

Preparación:

Preparar en un matraz por lo menos tres veces más grande que el volumen requerido de medio. Adicionar los ingredientes en agua destilada tibia y calentar con agitación constante hasta ebullición e inmediatamente retirar del calor. No esterilizar. Enfriar a 50°C y colocar en cajas de Petri. Dejar secar las placas a $37\text{-}45^\circ\text{C}$ antes de su uso.

6.3.5.3 Agar modificado con Celobiosa, Polimixina B y Colistina (mCPC)

Solución 1:

Ingredientes	Cantidades
Peptona	10 g
Extracto de carne	5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	20 g
Solución stock de colorantes 1 000X	1 mL
Agar	15 g

Agua destilada 900 mL

pH final $7,6 \pm 0,2$.

Preparación:

Ajustar el pH. Hervir hasta disolución del agar.

Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 minutos. Enfriar a $48-55^\circ\text{C}$.

Solución stock de colorantes 1 000 x:

Ingredientes	Cantidades
Azul de bromotimol	4 g
Rojo de cresol	4 g
Etanol al 95%	100 mL

Preparación:

Para obtener un color uniforme del medio se debe usar una solución stock en lugar de pesar cantidades muy pequeñas de colorantes en polvo. Disolver los colorantes en etanol hasta obtener una solución al 4% (peso/volumen). Agregar 1 mL de esta solución a cada litro de agar mCPC, la cual tiene al final 40 mg de azul de bromotimol y 40 mg de rojo cresol por litro.

Solución 2:

Ingredientes	Cantidades
Celobiosa	10 g
Colistina	400 000 UI
Polimixina B	100 000 UI
Agua destilada	100 mL

Preparación:

Disolver la celobiosa por calentamiento en agua destilada. Enfriar y agregar los antibióticos. Esterilizar por filtración, agregar la solución 2 a la solución 1. Mezclar y distribuir en cajas de Petri estériles.

6.3.5.4 Agar Triptona y Sal (Agar T₁N₁ y agar T₁N₂)

Ingredientes	Cantidades
Triptona o tripticaseína	10 g
Cloruro de sodio (NaCl)	10 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 L

Preparación:

Suspender los ingredientes y hervir hasta disolución del agar. Si se requiere el medio inclinado, distribuir en tubos. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos. Dejar solidificar los tubos inclinados. Para placas enfriar el medio a $45-50^\circ\text{C}$ y distribuir en cajas de Petri estériles.

Para T₁N₂ usar 20 g de cloruro de sodio.

6.3.5.5 Agar Gelatina (GA)

Ingredientes	Cantidades
Peptona	4 g
Extracto de levadura	1 g
Gelatina	15 g
Agar	15 g

Agua destilada 1 L

pH final $7,2 \pm 0,2$.

Preparación:

Suspender los ingredientes y hervir hasta disolución de la gelatina y el agar. Ajustar el pH. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos. Enfriar a $45-50^\circ\text{C}$ y distribuir en cajas de Petri estériles.

6.3.5.6 Agar Gelatina con Sal (GS)

Preparar Agar Gelatina (GA), pero adicionando 30 g de cloruro de sodio por cada litro. Suspender los ingredientes y hervir hasta disolver la gelatina y el agar. Ajustar el pH a $7,2 \pm 0,2$. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos. Enfriar a $45-50^\circ\text{C}$, colocar en cajas de Petri estériles. Si es necesario para inhibir la diseminación de *Vibrio spp* tal como *V. alginolyticus*, usar de 25-30 g de agar por litro.

6.3.5.7 Caldo Glucosa de Hugh-Leifson

Ingredientes	Cantidades
Peptona	2 g
Extracto de levadura	0,5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	30 g
Dextrosa	10 g
Púrpura de bromocresol	0,015 g
Agar	3 g
Agua destilada	1 L

pH final $7,4 \pm 0,2$.

Preparación:

Suspender los ingredientes y hervir hasta disolver el agar. Ajustar el pH. Colocar en tubos y esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

6.3.5.8 Medio Base de Descarboxilasa (Arginina, Lisina y Ornitina)

Ingredientes	Cantidades
Peptona o gelisato	5 g
Extracto de levadura	3 g
Glucosa	1 g
Púrpura de bromocresol	0,02 g
Agua destilada	1 L

Para A 1 litro de base adicionar

Caldo arginina 5 g de L-arginina

Caldo lisina 5 g de L-lisina

Caldo ornitina 5 g de L-ornitina

pH final $6,5 \pm 0,2$.

Preparación:

Ajustar el pH después de la esterilización. Distribuir en tubos con tapón de rosca y esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 min. Como control usar base sin suplemento.

6.3.5.9 Caldo Triptona y Caldos Triptona Sal (T_1N_0 , T_1N_3 y T_1N_6)

Ingredientes	Cantidades		
	T_1N_0	T_1N_3	T_1N_6

Triptona o Tripticaseína	10 g	10 g	10 g
Cloruro de sodio (NaCl)	---	30 g	60 g
Agua destilada	1 L	1 L	1 L

pH final $7,2 \pm 0,2$.

Preparación:

Distribuir en tubos con tapón de rosca de 16 x 150 mm. Tapar firmemente los tubos. Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min.

6.3.5.10 Agar Soya Tripticaseína (TSA)

Ingredientes	Cantidades
Tripticaseína o triptona	15 g
Soytona o fitona	5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L

pH final $7,3 \pm 0,2$.

Preparación:

Suspender los ingredientes en agua destilada y hervir durante un minuto hasta disolución del agar. Distribuir en tubos o matraces. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min. Dejar solidificar los tubos inclinados o dejar enfriar a $45-50^\circ\text{C}$ y distribuir en cajas de Petri.

6.3.5.11 Agar de Hierro Kligler (KIA)

Ingredientes	Cantidades
Peptona polipeptona	20 g
Lactosa	20 g
Dextrosa	1 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Citrato férrico amoniacal	0,5 g
Tiosulfato de sodio anhidro (NaS_2O_3)	0,5 g
Rojo de fenol	0,025 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L

pH final $7,4 \pm 0,2$.

Preparación:

Suspender los ingredientes y hervir hasta disolución del agar. Distribuir en tubos con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a $121 \pm 1^\circ\text{C}$. Dejar solidificar los tubos inclinados con un fondo de por lo menos 2 cm. Ajustar el pH.

6.3.5.12 Agar Arginina Glucosa Inclinado (AGS)

Ingredientes	Cantidades
Peptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Tristona	10 g
Cloruro de sodio (NaCl)	20 g
Glucosa	1 g
L-Arginina.(hidrocloruro)	5 g

Citrato férrico amoniacal	0,5 g
Tiosulfato de sodio anhidro (NaS ₂ O ₃)	0,3 g
Púrpura de bromocresol	0,02 g
Agar	13,5 g
Agua destilada	1 L

pH final 6,8 ± 0,2

Preparación:

Suspender los ingredientes en agua destilada y hervir hasta disolución del agar. Distribuir volúmenes de 5 mL en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar en autoclave a 121 ± 1°C durante 10 a 12 minutos. Dejar solidificar el medio inclinado con un fondo de por lo menos 2 cm.

6.3.5.13 Agar de Tres Azúcares y Hierro (TSI), como se describe en el numeral 6.1.5.4.1.

6.3.5.14 Agar de Hierro y Lisina (LIA), como se establece en el numeral 6.1.5.4.2.

6.3.5.15 Caldo Rojo de Metilo y Voges Proskauer (RM-VP), de conformidad con lo establecido en el numeral 5.6.5.4.

6.3.5.16 Medio de prueba de movilidad (MTM), como se describe en el numeral 6.2.6.9.

6.3.5.17 Caldo casamino ácidos extracto de levadura (CYE)

Ingredientes	Cantidades
Casamino ácidos	30 g
Extracto de levadura	4 g
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	0,5 g
Agua destilada	1 L

pH final 7,4 ± 0,2.

Preparación:

Disolver los ingredientes. Ajustar el pH. Colocar volúmenes de 10 mL en matraces de 50 mL. Esterilizar a 121 ± 1°C durante 15 min.

6.3.6 Preparación de la muestra.

6.3.6.1 Pescado, crustáceos crudos, crustáceos cocidos, moluscos bivalvos desconchados y alimentos diversos.

Pesar 50 g de la muestra en un vaso de licuadora con 450 mL de agua peptonada alcalina y homogeneizar por 1 min. Esto constituye la dilución 1:10. De esta dilución preparar diluciones 1:100 y 1:1000, en volúmenes de 9 o 90 mL de agua peptonada alcalina como diluyente, todas por duplicado seguir conforme a lo establecido en el numeral 6.3.7.

6.3.6.2 Moluscos bivalvos en concha

6.3.6.2.1 Lavarse las manos con agua y jabón y enjuagarse con alcohol al 70% v/v. Revisar y descartar aquellos moluscos que tengan la concha dañada o con las valvas abiertas.

6.3.6.2.2 Limpiar enérgicamente las valvas del molusco con un cepillo de cerdas de alambre y bajo el chorro del agua. Enjuagar con agua estéril y secar con una gasa estéril.

6.3.6.2.3 Tomar el molusco con una gasa estéril y abrir las valvas por el músculo abductor con un cuchillo desconchador estéril, evitando el derrame del licor. Colectar la carne y el licor en un vaso de precipitados. Una vez desconchados todos los moluscos que constituyen una muestra de una cantidad mínima de 80 g, pesar el vaso con la muestra y por diferencia determinar la cantidad del producto.

6.3.6.2.4 Adicionar agua peptonada al 0,5% o regulador de fosfatos estéril en la misma proporción al peso de la muestra. Transferir esta mezcla a un vaso de licuadora y homogeneizar durante 60 a 90 seg. Esto constituye una dilución 1:1.

6.3.6.2.5 Pesar 100 g de la mezcla anterior en 450 mL de agua peptonada alcalina, lo que constituye una dilución 1:10, Preparar diluciones 1:100, 1:1000 y 1:10000 por duplicado en volúmenes de 9 o 90 mL de agua peptonada alcalina como diluyente y seguir conforme a lo establecido en el numeral 6.3.7.

6.3.6.3 Frutas y vegetales

Colocar la muestra en una bolsa de plástico lo suficientemente grande para permitir enjuagar la muestra con 100 mL de agua peptonada alcalina. Preparar diluciones decimales por duplicado en volúmenes de 9 o 90 mL de agua peptonada alcalina como diluyente, y seguir conforme a lo señalado en el numeral 6.3.7.

6.3.6.4 Agua y hielo

Filtrar 3 litros de la muestra de agua a través de una membrana de 0,45 μm y colocarla en 10 mL de agua peptonada alcalina. Incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ y continuar como se describe en el numeral 6.3.8. Fundir las muestras de hielo y continuar de la misma forma que las muestras de agua.

6.3.7 Incubación

Incubar una de las series de diluciones a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ y la otra serie a $42 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Tomar la primera muestra para aislamiento a las 6 h y la segunda al término de la incubación para todas las diluciones.

6.3.8 Aislamiento en agar selectivo (TCBS)

6.3.8.1 Transferir a agar TCBS, una asada de la película de crecimiento superficial de cada dilución en agua peptonada alcalina, para cada tiempo y temperatura de incubación.

6.3.8.2 Incubar las placas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18 a 24 h.

6.3.8.3 Examinar las placas y seleccionar de cada una por lo menos dos colonias con las siguientes características: color amarillo (sacarosa positiva), de 2 a 3 mm, lisas, con centro opaco, bordes translúcidos. Sembrar estas colonias en caldo triptona sin cloruro de sodio y agar T_1N_1 . Incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18 a 24 h. Es importante señalar que el *V. mimicus* siendo una especie muy relacionada con *V. cholerae*, en esta etapa del análisis se descarta ya que las colonias en agar TCBS son de color verde (no fermentan la sacarosa)

6.3.9 Pruebas bioquímicas presuntivas

6.3.9.1 Prueba de oxidasa

6.3.9.1.1 Se fundamenta por la presencia del sistema citocromo-oxidasa en los miembros del género *Vibrio* en el cual el tetrametil-p-fenilendiamino interviene como un aceptor de electrones dentro del sistema citocromo-oxidasa, éste se reduce y adquiere la coloración azul.

6.3.9.1.2 Efectuar la prueba a partir de cultivos puros de agar T_1N_1 u otro medio que no contenga carbohidratos fermentables, tales como GA y GS. Un método fácil consiste en colocar un círculo de papel filtro en una caja de Petri y humedecerlo con algunas gotas de reactivo de oxidasa. Con un palito aplicador de madera, un mondadientes o una asa de platino estériles, sacar un poco de cultivo de la placa y tocar el papel humedecido. Si existen microorganismos oxidasa positivos, el papel se torna de un color púrpura oscuro o azul en pocos segundos. Las especies patógenas de *Vibrio* son oxidasa positivas a excepción del *V. metschnikovii*.

6.3.9.2 Prueba del hilo o cuerda

Se fundamenta en la ruptura de las células y la capacidad del DNA de formar hilos o cuerdas. Para llevar a cabo la prueba, colocar una gota de desoxicolato de sodio al 0,5% en una caja de Petri. Friccionar suavemente con un palillo o asa estériles aproximadamente 3 veces y levantar el asa o el palillo 0,5 cm. Observar la formación de un hilo o cuerda en un tiempo no mayor a 30 seg, lo que indica una prueba positiva.

6.3.9.3 Desarrollo en caldo triptona con 0 y 3% de NaCl.

6.3.9.3.1 Inocular las colonias en los caldos T_1N_0 y T_1N_3 e incubar a $35-37^\circ\text{C}$ durante 18 a 24 h. Reincubar los tubos que no muestren crecimiento durante 18 a 24 h adicionales. *V. cholerae* y *V. mimicus* crecen en los medios T_1N_0 y T_1N_3 . Algunas especies de bacterias de otros géneros que presentan reacciones similares a las de *V. cholerae* en medios de TSI y LIA no crecen en T_1N_3 . La mayoría de las especies de *Vibrio spp*, incluyendo algunos *V. cholerae* no 0:1, crecen en T_1N_3 únicamente.

6.3.9.3.2 Alternativamente usar agar gelatina (GA) y agar gelatina con 3% de NaCl (GS) para determinar la tolerancia de los cultivos puros a la sal. Dividir las placas en ocho sectores. Inocular una línea recta en el centro de un sector de las placas, tanto de GA como de GS con cada cultivo puro. Incubar durante 18 a 24 horas a $35 - 37^\circ\text{C}$. El *V. cholerae* y el *V. mimicus* crecen en ambas placas, porque ellos no requieren de sal. *Vibrio spp*, halófilicos se desarrollan sólo en la placa de GS. Para leer la reacción de la gelatinasa sostener la placa sobre una superficie negra. Un halo opaco se presenta alrededor de la colonia de los microorganismos gelatinasa positivos.

6.3.10 Pruebas bioquímicas complementarias

6.3.10.1 TSI, KIA y agar inclinado de arginina y glucosa (AGS).

Inocular las colonias individuales en medios de cultivo TSI o KIA y AGS, picar y estriar en el agar inclinado. Incubar los tubos inoculados, con el tapón no muy apretado, durante 18 a 24 horas a $35-37^\circ\text{C}$. Se

recomiendan estos medios porque las reacciones permiten efectuar una diferenciación presuntiva entre la mayoría de las especies de *Vibrio spp*, *Aeromonas spp*, *Plesiomonas*, *Shigelloides* y otras bacterias.

6.3.10.2 Prueba de oxidación-fermentación

A partir de un cultivo puro inocular por duplicado en tubos con caldo de glucosa de Hugh-Leifson. Recubrir un tubo con una capa de aceite mineral estéril o Vaspar líquido (50% de petrolato y 50% de parafina) a unos dos centímetros de profundidad. Incubar ambos tubos durante 1 a 2 días a 35-37°C. El ácido produce un cambio de coloración de púrpura a amarillo en el caldo Hugh-Leifson. Las especies de *Vibrio spp* pueden utilizar la glucosa tanto por vía oxidativa como fermentativa. Las especies de *Pseudomonas*, que comúnmente se aíslan del pescado y los mariscos con los métodos de enriquecimiento que se usan para las especies de *Vibrio*, utilizan la glucosa sólo por vía oxidativa.

6.3.11 Pruebas bioquímicas con tiras comerciales

6.3.11.1 Se fundamenta en la capacidad del microorganismo para utilizar ciertos sustratos, manifestado mediante el cambio de algún indicador presente en la prueba.

6.3.11.2 Sembrar la cepa problema en agar T₁N₁ en forma masiva e incubar a 35 ± 2°C durante 24 h.

6.3.11.3 Hacer una suspensión bacteriana con solución de cloruro de sodio al 0,85% estéril y aplicarla en los pozos del Kit comercial seleccionado. Seguir las instrucciones del fabricante.

6.3.12 Pruebas bioquímicas adicionales

Las reacciones bioquímicas para identificación de *V. cholerae* y otras especies bacterianas las cuales incluyen sensibilidad O/129, crecimiento a 42°C y pruebas ONPG, se señalan en el cuadro 1.

6.3.13 Pruebas serológicas de aglutinación.

La determinación del tipo serológico de *V. cholerae* sólo se aplica cuando las condiciones epidemiológicas sean cruciales.

6.3.13.1 Aglutinación con antisuero polivalente *V. cholerae* O:1 y monovalentes Inaba y Ogawa.

6.3.13.1.1 Se fundamenta en la reacción antígeno-anticuerpo originando un precipitado en 15 seg.

6.3.13.1.2 En un portaobjetos limpio y libre de grasa, colocar 2 gotas de solución de cloruro de sodio al 1% y 1 gota del antisuero a probar. Tomar una asada de la colonia del agar T₁N₁ y hacer una suspensión bacteriana con la gota de solución salina. Tomar una asada de esta suspensión y mezclar con la gota del antisuero. Mover el portaobjetos para mezclar y observar la reacción en ambas gotas ya que hay cepas que autoaglutinan con la solución salina. Descartar este tipo de colonia.

6.3.13.1.3 Si la colonia aglutina con el antisuero polivalente, probar con sueros monovalentes Inaba y Ogawa.

6.3.13.2 Prueba de toxicidad por aglutinación pasiva inversa en látex

6.3.13.2.1 Se fundamenta en una reacción antígeno-anticuerpo, este último absorbido en partículas de látex; donde el antígeno es la toxina producida por *V. cholerae*. La unión de ambos provoca la formación de una película o membrana en el fondo del pozo de la placa, lo cual se considera como una prueba positiva.

6.3.13.2.2 Sembrar las cepas de referencia de *V. cholerae* O:1 toxigénico y *V. cholerae* O:1 no toxigénico, en agar T₁N₁ en forma masiva e incubar a 35 ± 2°C durante 24 h.

6.3.13.2.3 Para efectuar la prueba, sembrar una asada de los cultivos anteriores en 4 mL de caldo CYE por separado e incubar a 35 ± 2°C durante 6 h.

6.3.13.2.4 Tomar 0,2 mL del cultivo anterior y adicionarlo a 10 mL de caldo CYE en un matraz Erlenmeyer para cada cultivo. Incubar a 37 ± 2°C en un baño de agua con agitación durante 16 h.

6.3.13.2.5 Centrifugar a 900 X g durante 20 min a 4°C. Separar el sobrenadante o filtrar el cultivo usando membranas de 0,2 a 0,45 µm.

6.3.13.2.6 Reconstituir la toxina control con 0,5 mL del diluyente, agitar suavemente hasta que el contenido se haya disuelto. El uso de la toxina control muestra el comportamiento de una reacción positiva y se debe usar sólo para confirmar un funcionamiento correcto del látex. De esta forma los reactivos del látex y el diluyente están listos para su uso.

6.3.13.2.7 Agitar los reactivos antes de su uso.

6.3.13.2.8 Arreglar la placa de microtitulación de manera que cada fila consista de 8 pozos, usar dos filas para cada muestra.

6.3.13.2.9 Adicionar 25 µL de diluyente en cada pozo de las dos filas, excepto el primero de cada fila.

6.3.13.2.10 Adicionar 25 µL de la muestra en el primer y segundo pozo de cada fila.

6.3.13.2.11 Hacer diluciones 1:2 a partir del segundo pozo de cada una de las dos filas. Tomar 25 µL hasta el pozo 7, dejar el último pozo que contiene diluyente.

6.3.13.2.12 Adicionar 25 µL de látex sensibilizado a cada pozo de la primera fila.

6.3.13.2.13 Mezclar el contenido rotando la placa. Evitar derrames de líquido entre los pozos.

6.3.13.2.14 Cubrir la placa con plástico adherible para evitar la evaporación. Colocar la placa en lugar libre de vibraciones durante 20 a 24 h a temperatura ambiente, evitando moverla. Colocar la placa en un lugar con fondo negro para facilitar la lectura durante la incubación.

6.3.13.2.15 Examinar cada pozo de cada fila y comparar con los testigos. Descontaminar los tubos de centrifuga, los filtros de membrana, las placas de microtitulación y las puntas para pipetas, por esterilización en autoclave o por desinfección con solución de hipoclorito al 1,3%, antes de su desecho. Desechar los controles de la toxina y los extractos de los cultivos en solución de hipoclorito al 1,3%.

6.3.13.2.16 La presencia de un botón en el fondo del pozo se considera una prueba negativa, mientras que la formación de una capa difusa en forma de membrana se considera como una prueba positiva. En ocasiones hay la presencia de ambas formas, lo cual se considera también como una prueba positiva.

6.3.13.2.17 El resultado de la prueba en los pozos de la fila que contiene el látex control debe ser negativo. En algunos casos puede ocurrir la aglutinación no específica. En tales casos los resultados deben ser interpretados como positivos, si se obtiene una reacción positiva con el látex sensibilizado en la dilución más alta de la muestra a probar.

6.3.13.2.18 El resultado de la prueba para el último pozo en todas las filas debe ser negativo. Si se observa en estos pozos un comportamiento positivo la prueba debe ser invalidada.

Nota: La sensibilidad de esta prueba es de 1 a 2 ng/mL de enterotoxina presente en el cultivo. Concentraciones más bajas producen resultados negativos.

6.3.14 Expresión de resultados

Comparar los resultados obtenidos conforme a los establecidos en los cuadros 1, 2 y 3.

Cuadro 1

Reacciones bioquímicas de *V. cholerae*

Prueba o sustrato	Positivo	Negativo	Reacción de <i>V. cholerae</i>
H ₂ S (TSI o KIA y AGS)	Precipitado negro	Sin precipitado	-
Gas (TSI o KIA y AGS)	Producción de gas	Sin producción de gas	-
Triptona: 0% NaCl	Crecimiento visible	Sin crecimiento	+
3% NaCl	Crecimiento visible	Sin crecimiento	+
6% NaCl	Crecimiento visible	Sin crecimiento	Usualmente -
Oxidación-fermentación	Amarillo	Púrpura	+
Caldo descarboxilasa:			
Arginina	Púrpura	Amarillo	+
Lisina	Púrpura	Amarillo	-
Ornitina	Púrpura	Amarillo	+
Oxidasa	Púrpura oscuro o azul	Sin coloración	+
Hilo o cuerda	Formación de un hilo o cuerda	Sin formación de hilo o cuerda	+

Cuadro 2

Reacciones bioquímicas adicionales de *V. cholerae*

Prueba	Reacción <i>V. cholerae</i>
--------	-----------------------------

Crecimiento a 42°C	Positivo
Prueba de ONPG	Positivo
0/129 sensitiva	Sensible para 10 y 150 µg 0/129

Cuadro 3
Reacciones de algunos *Vibrio* en agar KIA, TSI y AGS

Microorganismos	KIA		TSI		AGS	
	Estría	Picadura	Estría	Picadura	Estría	Picadura
<i>V. cholerae</i>	R	A	A(R)*	A	R	A
<i>V. mimicus</i>	R	A	R(A)*	A	R	A
<i>V. parahemolyticus</i>	R	A	R	A	R	A
<i>V. alginolyticus</i>	R	A	A	A	R	A
<i>V. vulnificus</i>	R o A	A	R(A)*	A	R	A
<i>V. hydrophila</i>	R o A	A	R o A	A	R	R
<i>V. shigelloides</i>	R o A	A	R o A	A	ND	ND

* = Raramente
R = Rojo (Alcalino)
A = Amarillo (Acido)
a = Ligeramente ácido
ND = No determinado

Nota: Ninguna de las especies de *Vibrio* enumeradas produce sulfuro de hidrógeno, ni una cantidad perceptible de gas a partir de glucosa en medios KIA, TSI o AGS. Algunas especies de *Aeromonas* pueden producir gas a partir de glucosa en estos medios.

6.3.15 Informe de la prueba

Ausencia o presencia de *Vibrio cholerae* 0:1

6.4 Determinación de *Clostridium botulinum* y sus toxinas.

6.4.1 Principio del método.

Se basa en demostrar la presencia de la toxina botulínica por inyección a ratones con extractos de alimentos y observar el efecto letal. Asimismo, se comprueba con el antisuero específico la neutralización de la toxina. La determinación de *C. botulinum* se basa en el cultivo de muestras de alimentos en condiciones de anaerobiosis en medios específicos y la subsecuente demostración de la toxina.

6.4.2 Equipo

6.4.2.1 Refrigerador.

6.4.2.2 Centrífuga refrigerada con capacidad de 15 000 x g.

6.4.2.3 Balanza analítica, con una sensibilidad de 0,1 mg.

6.4.2.4 Campana de flujo laminar (opcional).

6.4.2.5 Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de ± 2°C, provista con termómetro calibrado o verificado.

6.4.2.6 Microscopio compuesto.

6.4.2.7 Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH.

6.4.2.8 Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato o bien un homogeneizador peristáltico (stomacher).

6.4.2.9 Baño de agua a una temperatura de 45 ± 2°C.

6.4.3. Materiales

6.4.3.1 Material general

- 6.4.3.1.1 Pinzas estériles.
- 6.4.3.1.2 Pipetas de diferentes volúmenes estériles.
- 6.4.3.1.3 Toallas desechables.
- 6.4.3.1.4 Mecheros Bunsen o Fisher.
- 6.4.3.1.5 Abrelatas bacteriológico estéril.
- 6.4.3.1.6 Mortero y pistilo estériles.
- 6.4.3.1.7 Tubos de cultivo.
- 6.4.3.1.8 Portaobjetos.
- 6.4.3.1.9 Jarras y sistemas de anaerobiosis.
- 6.4.3.1.10 Tubos de centrífuga.
- 6.4.3.1.11 Propipeta o bulbo.
- 6.4.3.1.12 Guantes de cirujano.
- 6.4.3.1.13 Jeringas desechables de 1 y 3 mL con aguja del 15 y 25 mm de largo.
- 6.4.3.1.14 Filtros de membrana de 0,45 μm .
- 6.4.3.2 Material biológico

Ratones de preferencia hembras de 20 a 30 g, cepa CFI o NIH

Cepa NIH: Nomenclatura completa: Hsd: NIHS, albina derivada de una colonia núcleo obtenida del National Institute of Health, Bethesda.

Cepa CF1: Nomenclatura completa: Hsd: NSA cepa derivada de NIH Suiza.

6.4.4 Reactivos

Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y para efectos de este método por agua se entiende agua destilada.

- 6.4.4.1 NaOH 0,1 N o NaHCO_3 saturado para limpiar posibles derrames.
- 6.4.4.2 Reactivos para tinción de Gram, como se describe en el numeral 5.6.4.4.
- 6.4.4.3 Solución amortiguadora de fosfatos con gelatina.

Ingredientes	Cantidades
Gelatina	2 g
Fosfato disódico (Na_2HPO_4)	4 g
Agua destilada	1 L

Preparación:

Ajustar a pH 6,2 con solución de ácido clorhídrico 4N. Distribuir en frascos con tapón de rosca, esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 20 min. Enfriar a temperatura ambiente y almacenar a 4°C .

6.4.4.4 Solución de tetraciclina al 0,2%.

Disolver 50 mg de tetraciclina en 25 mL del diluyente fosfato de gelatina, mantener a 4°C hasta 4 días. Si se requiere almacenar por más tiempo, congelar en pequeñas porciones. Evitar la recongelación.

6.4.4.5 Solución de tripsina (1:250).

a) Solución al 1%

Disolver 200 mg de tripsina en 20 mL de agua destilada. NO ALMACENAR.

b) Solución al 1,4%.

Disolver 280 mg de tripsina en 20 mL del diluyente fosfato de gelatina y filtrar a través de membrana de 0,45 μm . Usar vacío para obtener un efecto parcial de aireación del filtrado.

6.4.4.6 Antisueros

A,B,E; A,B; A,B,E,C*,D*,F

* Investigación de sospecha de botulismo en animales.

6.4.5 Medios de cultivo

En el caso de utilizar medio de cultivo deshidratado, seguir las instrucciones del fabricante.

6.4.5.1 Medio de carne cocida (CMM).

Ingredientes	Cantidades
Corazón de res	454 g
Proteosa peptona	20 g
Dextrosa	2 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Extracto de corazón de res	1 L

pH final $7,2 \pm 0,2$

Preparación:

Picar el corazón de res, sumergir en agua y calentar hasta ebullición durante 1 h. Enfriar, ajustar el pH a 7,0, y hervir durante 10 minutos. Filtrar a través de muselina y presionar para drenar el exceso de líquido de la carne. Guardar la carne cocida. Agregar los ingredientes al filtrado y ajustar a pH 7,0, agregar agua hasta llevar a un volumen de 1 L. Filtrar a través de papel filtro poroso. Se puede conservar el caldo y la carne en congelación por separado. Agregar el corazón cocido y picado a tubos de ensayo de 18 x 150 mm o 20 x 150 mm a una altura de 1,2 a 2,5 cm del tubo y adicionar de 10 a 12 mL del caldo. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos. Si este medio se almacena por más de 12 h después de su preparación, debe calentarse a ebullición por 10 minutos y enfriar antes de su uso.

6.4.5.2 Caldo tripticaseína peptona glucosa extracto de levadura (TPGY).

Ingredientes	Cantidades
Tripticaseína	50 g
Peptona	5 g
Glucosa	4 g
Extracto de levadura	20 g
Tioglicolato de sodio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2\text{S}$)	1 g
Agua destilada	1 L

pH final $7,0 \pm 0,2$

Preparación:

Disolver los ingredientes en agua caliente, enfriar y ajustar a pH 7,2. Distribuir volúmenes de 21 mL en tubos de 20 x 150 mm con tapón de rosca. Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min. Enfriar a temperatura ambiente y almacenar en refrigeración hasta 6 semanas. Si se almacena más de 12 h, tratarlo con calor como se describe en el numeral 6.4.9.1.

6.4.5.3 Caldo tripticaseína peptona glucosa extracto de levadura adicionado con tripsina (TPGYT).

Ingredientes	Cantidades
Tripticaseína	50 g
Peptona	5 g
Glucosa	4 g
Extracto de levadura	20 g
Tioglicolato de sodio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2\text{S}$)	1 g
Agua destilada	1 L

pH final $7,0 \pm 0,2$

Preparación:

Disolver los ingredientes en agua caliente, enfriar y ajustar a pH 7,2. Distribuir en volúmenes de 21 mL en tubos de 20 x 150 mm con tapón de rosca. Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 min. Enfriar a temperatura ambiente y almacenar en refrigeración hasta 6 semanas. Si se almacena más de 12 h tratarlos con calor como se describe en el numeral 6.4.9.1. Agregar 1,5 mL de solución de tripsina al 1,4% por cada tubo con 21 mL del medio TPGY. Mezclar muy suavemente. Este medio no se puede almacenar.

6.4.5.4 Agar hígado de ternera yema de huevo.

a) Agar hígado de ternera.

Ingredientes	Cantidades
Infusión de hígado	50 g
Infusión de ternera	500 g
Proteosa peptona	20 g
Neopeptona	1,3 g
Tristona	1,3 g
Dextrosa	5 g
Almidón soluble	10 g
Caseína isoelectrica	2 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Nitrato de sodio (NaNO ₃)	2 g
Gelatina	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L

pH final 7,3 ± 0,2

Preparación:

Calentar con agitación constante hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave a 121 ± 1°C por 15 min. Ajustar el pH. Agregar por cada 500 mL del medio base fundido, 40 mL de la suspensión salina de yema de huevo. Mezclar y vaciar a cajas de Petri estériles. Secar las placas a temperatura del laboratorio por 2 días o a 35°C por 24 horas. Verificar esterilidad de las placas. Almacenar en refrigeración.

b) Emulsión de yema de huevo al 50%.

Lavar los huevos con un cepillo suave y dejar escurrir. Sumergirlos por 1 h, en solución de cloruro mercúrico al 0,1% y dejar escurrir. Sumergir en una solución de etanol al 70% durante 30 min y dejar escurrir. Abrir los huevos en condiciones asépticas y descartar las claras. Colocar las yemas en un recipiente estéril y mezclar con un volumen igual de solución salina fisiológica al 0,85% estéril. Guardar en refrigeración hasta su uso.

6.4.5.5 Agar para aislamiento de *C. botulinum* (CBI).

El agar CBI es una modificación del medio agar McClung Toabe para el aislamiento selectivo y diferencial de *C. botulinum*, el cual puede aislarse de los cultivos toxigénicos de CMM, provenientes de muestras de heces, líquido gástrico o alimentos. El medio de agar CBI contiene: cicloserina 250 µg/mL, sulfametoxazol 76 µg/mL y trimetoprim 4 µg/mL en la base del medio agar McClung Toabe yema de huevo.

Agar McClung Toabe

Ingredientes	Cantidades
Proteosa peptona	40 g
Dextrosa	2 g
Fosfato de sodio dibásico (NaH ₂ PO ₄)	5 g
Fosfato de potasio monobásico (K ₂ HPO ₄)	1 g
Cloruro de sodio (NaCl)	2 g
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	0,1 g
Agar	25 g
Agua destilada	1 L
pH final 7,6 ± 0,2	
Extracto de levadura	5 g
Suspensión de yema de huevo	100 mL

Solución de antibióticos

Cicloserina	250 mg o 25 mL de una solución al 1%
Sulfametoxazol	76 mg o 4 mL de una solución al 1,9%

Disolver el sulfametoxazol en solución de NaOH 2 N.

Lactato de Trimetoprim	4 mg o 4 mL de una solución al 0,1% por cada 100 mL de medio base
------------------------	---

Esterilizar por filtración.

Preparación:

Agregar el extracto de levadura y los ingredientes del agar McClug Toabe a un matraz de 2 L que contenga 900 mL de agua destilada. Mezclar y calentar hasta disolución. Ajustar a pH 7,5. Esterilizar 15 minutos a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ en autoclave. Enfriar a 55°C en baño de agua y en condiciones asépticas agregar 100 mL de la suspensión de yema de huevo al 50%. Agregar los volúmenes necesarios para conservar la concentración de antibióticos por litro de medio base. Mezclar y distribuir en cajas de Petri estériles. Dejar solidificar y colocar en bolsas de plástico. Guardar en refrigeración hasta su uso. Estas placas pueden almacenarse hasta 1 mes aproximadamente.

6.4.5.6 Agar para esporulación de Eklund.

Ingredientes	Cantidades
Trypticaseína	4 g
Peptona	1 g
Glucosa	0,1 g
Extracto de levadura	1 g
Agar	4 g
Agua destilada	200 mL

Preparación:

Disolver los ingredientes en agua caliente a excepción del agar. Ajustar a pH 7,8 y agregar el agar. Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 min. Enfriar a 50°C y agregar 2 mL de solución al 10% de clorhidrato de cisteína previamente esterilizada por filtración, 12 mL de emulsión de yema de huevo y 2 mL de sangre citratada de bovino o borrego. Preparar las placas. Este medio es particularmente adecuado para la esporulación de *C. botulinum* del grupo II.

6.4.6 Procedimiento

6.4.6.1 Toma y manejo de muestras

6.4.6.1.1 Alimentos

Las muestras de alimentos deben tomarse de sobrantes de los alimentos sospechosos o de recipientes cerrados. Cuando están involucrados alimentos comerciales, es importante observar la etiqueta, No. de lote del fabricante, o cualquier dato relevante que pueda identificar el origen de la muestra.

6.4.6.1.2 Clínicas

Las muestras clínicas para el análisis incluyen: aproximadamente 10 g de materia fecal, contenido gástrico (ajustado a un pH aproximado de 6,0 con hidróxido de sodio 0,1 N) y suero (colectado de 20 mL de sangre ANTES DE ADMINISTRAR LA ANTOXINA). Cuando se sospecha de botulismo infantil es importante analizar las heces. Si fuera necesario, analizar también las manchas o partes sólidas de los pañales.

6.4.6.2 Examen microscópico de los alimentos sospechosos

Este examen no es esencial para la detección de *C. botulinum*, pero facilita la selección de los alimentos sospechosos para el análisis. Preparar frotis directos y hacer tinción de Gram. Si el alimento contiene exceso de grasa, sumergir los portaobjetos fijados al calor por 1-2 minutos en xilol antes de teñir.

6.4.6.3 Preparación de muestras para el análisis de las toxinas

Separar la muestra de alimento en dos porciones; una para cultivo de células vegetativas de *C. botulinum* y otra para la prueba de toxicidad. Mantener las muestras en refrigeración hasta el momento de su análisis.

6.4.6.4 Preparación de la muestra.

6.4.6.4.1 Alimentos líquidos

Centrifugar aproximadamente 20 mL del alimento a 15 000 x g durante 20 minutos. Decantar cuidadosamente el sobrenadante o extraer con una jeringa desechable de 19 x 25 mm. Cubrir el tubo y conservar a 4°C para hacer el cultivo del sedimento posteriormente. Repetir la centrifugación si el sobrenadante aún no está claro. Esterilizar el sobrenadante por filtración a través de una membrana de 0,45 µm adaptada a una jeringa desechable. Ocasionalmente puede requerirse una prefiltración durante el proceso de filtración. El propósito de la esterilización es evitar una infección y a su vez una muerte inespecífica de los ratones inoculados.

6.4.6.4.2 Alimentos semilíquidos

Colocar 10-15 g del alimento en tubos de centrifuga de 40 mL, agregar un volumen igual de solución reguladora de fosfatos con gelatina y homogeneizar en vórtex. Centrifugar y proceder conforme lo establecido en el numeral 6.4.6.4.1.

6.4.6.4.3 Alimentos sólidos

Colocar 10 - 20 g del alimento en un vaso de licuadora o mortero. Agregar suficiente solución reguladora de fosfatos con gelatina para obtener cuando menos 10 mL de sobrenadante después de la centrifugación. La dilución del alimento debe estar entre 1:1 a 1:3. Licuar a velocidad alta por 1-2 minutos. Los vasos de licuadora deben cerrarse herméticamente para prevenir la formación de aerosoles. Centrifugar y proceder como se describe en los numerales 6.4.6.4.1 y 6.4.6.4.2.

6.4.6.4.4 Alimentos enlatados

Lavar y secar la superficie de la lata. Cubrir la tapa con etanol al 96%, dejar por 2 minutos; decantar y flamear el alcohol residual. Colocar la lata en una bolsa de plástico para prevenir la dispersión de aerosoles y abrir con un abrelatas estéril. Proceder de conformidad con los numerales 6.4.6.4.1, 6.4.6.4.2 o 6.4.6.4.3.

6.4.6.4.5 Suero

Idealmente deben obtenerse 10 mL del suero. El suero usado sólo sirve antes del tratamiento con el antisuero. Si está turbio, centrifugar a 15 000 x g durante 20 min y decantar el sobrenadante.

6.4.6.4.6 Heces

Colocar 10 g en un tubo para centrifuga de 40 mL de capacidad. Agregar suficiente cantidad de solución reguladora de fosfatos con gelatina para obtener al menos 10 mL de sobrenadante después de la centrifugación. Mezclar en vórtex durante 2 o 3 min. Conservar la mezcla a 4°C por 2 h. Homogeneizar en vórtex. Centrifugar y proceder conforme a lo señalado en el numeral 6.4.6.4.1.

Las muestras líquidas, enemas y el contenido intestinal se pueden centrifugar directamente con una pequeña cantidad o sin la adición de solución reguladora de fosfatos con gelatina.

Ocasionalmente los sobrenadantes de muestras clínicas no se pueden filtrar, en este caso, agregar 1 mL de una solución de tetraciclina al 0,2% por cada 9 mL del sobrenadante.

6.4.6.4.7 Contenido gástrico

Ajustar si es necesario el pH a 5,5-6,5 con una solución de NaOH 1 N. Evitar que el valor de pH sea mayor a 7,0. Centrifugar y proceder como se describe en el numeral 6.4.6.4.1.

6.4.6.4.8 Otras muestras clínicas

Tratar las muestras semilíquidas y sólidas conforme a lo establecido en los numerales 6.4.6.4.2 y 6.4.6.4.3.

6.4.7 Análisis de las toxinas

6.4.7.1 Prueba preliminar para la identificación de muestras tóxicas (aplicable sólo en caso de brote).

6.4.7.1.1 Distribuir el filtrado en volúmenes de 1,8 mL en cada uno de tres tubos de ensayo de 13 X 100 mm, marcados del 1-3. El tubo No. 1 dejarlo sin tratamiento, al No. 2 agregar 0,2 mL de solución acuosa de tripsina. Incubar a 35 ± 2°C durante 1h agitando ocasionalmente con cuidado. Calentar el tubo No. 3 en baño de agua a ebullición durante 10 min. Si la toxina botulínica está presente se inactiva con el tratamiento térmico.

6.4.7.1.2 Inyectar por separado, a cada uno de dos ratones un volumen de 0,5 mL del contenido de los tubos 1-3 por vía intraperitoneal (i.p.). Observar periódicamente síntomas característicos de botulismo durante

48 h. Registrar síntomas y muertes. Los signos típicos de botulismo en ratón empiezan generalmente dentro de las primeras 24 h, los cuales son: pelo erizado, estrechamiento de cintura, dificultad para respirar, parálisis de los miembros posteriores seguida de parálisis total, jadeo al respirar y finalmente la muerte debida a paro respiratorio.

6.4.7.1.3 Si después de 48 h todos los animales han muerto, excepto los que recibieron la muestra calentada, repetir la prueba diluyendo los sobrenadantes de las muestras preparadas como se describe en el numeral 6.4.7.1.1. Esto último con el propósito de obtener el punto final de la dosis mínima mortal (DMM), como un estimado de la cantidad de la toxina presente. Es necesario contar con diluciones que maten y que no maten a los animales. Puede iniciarse con diluciones 1:5, 1:10 y 1:100 de los sobrenadantes sin tratar y tratados con tripsina. Diluir con solución amortiguadora de fosfatos gelatina. De cada dilución inocular dos ratones y continuar conforme a lo señalado en el numeral 6.4.7.1.2. La DMM está contenida en la dilución más alta que mata a los dos ratones (o a todos los ratones inoculados). De estos resultados, puede calcularse el número de DMM/mL.

6.4.8 Tipificación de la toxina

6.4.8.1 Rehidratar las antitoxinas con solución salina fisiológica. No usar agua glicerinada. Diluir las antitoxinas tipo A, B, C y F en solución salina fisiológica a una concentración de una unidad internacional (UI)/0,5 mL. Preparar suficiente cantidad de estas soluciones para inyectar, vía i.p., 0,5 mL a cada uno de los ratones (por cada dilución de material tóxico por probar).

6.4.8.2 Utilizar la dilución tóxica que haya dado la DMM más alta; tanto en tripsinados como en no tripsinados. Preparar diluciones de la muestra tóxica para cubrir 10, 100 y 1000 veces la DMM determinada conforme a lo establecido en el numeral 6.4.7.1.3. Si alguna de las muestras tripsinizadas resultó ser de las más letales, es necesario preparar una nueva muestra recientemente tratada con tripsina, debido a que la acción continua de éste puede destruir a la toxina.

6.4.8.3 Inyectar a los ratones con antitoxinas monovalentes como se describe en el numeral 6.4.8.1. Esperar de 30 min a 1 h, antes de retarlos con la preparación tóxica por vía i.p. Inyectar dos ratones por cada antitoxina específica y también dos ratones, no protegidos con cada dilución tóxica (como controles). Se requiere un total de 36 ratones por cada muestra por probar: tres diluciones cada una tratada con 4 tipos de antitoxina (A,B,E y F), 6 ratones para cada tipo de antitoxina (24 ratones) más dos ratones de cada dilución como control. Continuar como se indica en el numeral 6.4.7.1.2. Si los resultados indican que las toxinas no fueron neutralizadas, repetir la prueba utilizando antitoxinas monovalentes tipos C y D, más una mezcla de antitoxinas tipos A-F.

6.4.9 Aislamiento de *Clostridium botulinum*.

6.4.9.1 Antes de la inoculación eliminar el exceso de aire disuelto en los tubos preparados con medio caldo carne cocida (CMM) y caldo glucosa peptona tripticaseína extracto de levadura (TPGY), mediante calentamiento en baño de agua a ebullición por 10 min (asegurarse de que las tapas de los tubos estén flojas al hacer este proceso). Enfriar rápidamente y ajustar las tapas sin agitar los tubos.

6.4.9.2 Agregar a los tubos de TPGY, 1,5 mL de una solución de tripsina al 1,4% y mezclar suavemente. Marcar los tubos con una letra "T" (TPGYT). Marcar con 1 y 2 los tubos que contienen medio CMM y con 3 y 4 los tubos con medio TPGYT como señala la siguiente tabla:

Tubo No.	Medio	Tratamiento
1	CMM	Ninguno
2	CMM	Calor
3	TPGYT	Ninguno
4	TPGYT	Alcohol

6.4.9.3 Cualquier tipo de muestra incluyendo a los alimentos pueden servir como inóculo; éstas además tienen la ventaja de que no contienen inhibidores potenciales, los cuales se han eliminado junto con el sobrenadante, de aquí que los sedimentos pueden contener grandes cantidades de microorganismos por unidad de volumen.

6.4.9.4 Colocar de 1 a 2 g de inóculo en cada uno de los tubos marcados con los números 1 a 3 (introducir el inóculo cuidadosamente, en la superficie del caldo, hacia el fondo del tubo). Calentar el tubo No. 2 en baño de agua a 75°C por 20 min con el fin de seleccionar esporas resistentes al calor. Para seleccionar esporas sensibles o resistentes al calor suspender aproximadamente 1 g de inóculo en un volumen de 10 a 20 mL de solución de etanol al 50% o mezclar el inóculo 1:1 con etanol absoluto, cuando la muestra es líquida. Mantener las suspensiones o mezclas a temperatura ambiente por 60 min, centrifugar a 15 000 x g durante 15 min y pasar el sedimento al tubo No. 4.

6.4.9.5 Inocular los tubos de CMM a 35°C y los de TPGYT a 28°C. Después de 5 días de incubación observar los cultivos y verificar la turbiedad, producción de gas, digestión de las partículas de carne y el olor característico.

6.4.9.6 Examinar los cultivos al microscopio de contraste de fases o por tinción de Gram. Observar la morfología típica de *Clostridium*, la cual se caracteriza por la presencia de esporas y el sitio de la spora dentro de la célula, parecida a una raqueta (spora terminal). Para determinar la presencia de cultivos toxigénicos, continuar el ensayo como se indica en los numerales 6.4.7 y 6.4.8, partiendo del cultivo centrifugado y filtrado. Generalmente a los 5 días de incubación se tiene el crecimiento más activo y la mayor concentración de toxina botulínica. Si en los caldos de enriquecimiento, no hay crecimiento a los 5 días de incubación, antes de descartar la muestra como negativa, incubar otros 10 días para identificar una posible germinación retardada por la presencia de esporas dañadas.

6.4.10 Aislamiento de *Clostridium botulinum* a partir de cultivos toxigénicos.

El aislamiento de cepas productoras de botulismo, se facilita si se dan todas las condiciones para la producción de toxina. Si los cultivos de los tubos Nos. 2 o 4 son toxigénicos, uno de éstos debe seleccionarse. Sembrar directamente en agar hígado de ternera yema de huevo o en agar para el aislamiento de *Clostridium botulinum* (CBI). En estos medios no se ha observado un enmascaramiento por microflora atípica. En el caso de que predominara flora atípica combinada con la presencia de algunas esporas de *C. botulinum*, el inóculo debe hacerse previo tratamiento con etanol. Las placas de agar deben estar secas para evitar que el cultivo se extienda. Incubar las cajas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48 h, bajo condiciones de anerobiosis.

6.4.11 Aislamiento de *C. botulinum* de cultivos con presencia moderada de microorganismos atípicos.

Si los cultivos 2 y 4 son tóxicos, pueden excluirse los tubos 1 y 3. Seleccionar los cultivos sobre las siguientes bases:

- i) Presenta las características descritas en el numeral 6.4.9.6
- ii) Observar en la preparación, un mínimo de 10% de bacilos Gram positivos.
- iii) Considerar qué cultivos viejos de *C. botulinum* pueden aparecer como Gram negativos.

6.4.12 Selección de colonias típicas de *Clostridium botulinum*.

Seleccionar 10 colonias bien aisladas sobre el agar las cuales pueden ser elevadas, planas, lisas o rugosas. Generalmente las colonias se extienden y presentan bordes irregulares. En medios de cultivo a base de yema de huevo, las colonias presentan superficie iridiscente, al examinarlas con luz oblicua. Es usual referirse a esta zona como una capa perlada que la mayoría de los casos se extiende siguiendo el borde irregular de la colonia. Además de esta zona perlada, las colonias de *C. botulinum* tipos C, D y E están rodeadas de un halo (de 2 - 4 mm) amarillo opaco de precipitación. Las colonias de tipos A y B presentan esta zona de precipitación más pequeña.

6.4.13 Inoculación

Pasar a caldo TPGY cada una de las colonias seleccionadas como tipo E. Inocular los otros tipos de colonias a caldo carne cocida. Incubar a 28°C durante 5 días. Hacer pruebas para determinar las toxinas, conforme a lo establecido en el numeral 6.4.7. Inocular por duplicado los cultivos toxigénicos en agar hígado de ternera yema de huevo, incubar una placa en anaerobiosis y otra en aerobiosis para garantizar la pureza del cultivo.

Nota: Es necesario inocular un gran número de colonias debido a que *C. botulinum* puede enmascarse por otros clostridia que presentan características coloniales similares.

6.4.14 Aislamiento de *C. botulinum* de cultivos con grandes cantidades de microorganismos atípicos.

6.4.14.1 Si en la tinción de Gram se observan bacilos Gram positivos con esporas, mezclar 2 mL del cultivo, con 2 mL de etanol al 96%, y dejar a temperatura ambiente por 60 min. Inocular una asada en agar hígado de ternera yema de huevo y en agar aislamiento de *C. botulinum*, y continuar como se indica en el numeral 6.4.10.

6.4.14.2 Si no se presenta esporulación en el medio de enriquecimiento, reincubar por otra semana a 30°C o extender 0,1 mL del cultivo en agar de esporulación de Eklund, e incubar las placas en anaerobiosis a 30°C hasta que las esporas estén presentes en cantidades significativas (generalmente se requieren de 5 a 10 días. Suspende una asada del cultivo en aproximadamente 2 mL de etanol al 50%, dejar a temperatura ambiente

por 60 minutos, e inocular en agar hígado de ternera yema de huevo y en agar CBI. Continuar como se describe en el numeral 6.4.10.

6.4.15 Criterios generales a considerar en el análisis de toxinas de *C. botulinum*.

6.4.15.1 Las primeras 24 h son las más importantes para observar los síntomas y muerte de los ratones. De 98 a 99% de los animales mueren en las primeras 24 h. Los síntomas típicos de botulismo y muerte pueden presentarse dentro de las primeras 4 a 6 h.

6.4.15.2 Si las muertes se presentan después de 24 h, se debe tomar con cierta duda, excepto si los síntomas de botulismo son claramente evidentes.

6.4.15.3 Si los ratones mueren con diluciones de la muestra 1:2 o 1:5, pero ningún animal muere con diluciones más altas se considera como muy dudoso. Las muertes pueden ser por causas inespecíficas.

6.4.15.4 Los ratones pueden marcarse con colorante que no se borre fácilmente y colocarlo en diferentes partes del ratón para identificar la dilución o tratamiento de la muestra.

6.4.15.5 Los ratones inoculados con toxina botulínica suelen ser hiperactivos antes de presentarse los síntomas característicos.

6.4.15.6 Se puede dar agua y comida a los ratones después de inoculados, lo cual no interfiere con la prueba.

6.4.15.7 La antitoxina rehidratada puede mantenerse hasta 6 meses en refrigeración o en congelación por tiempo indefinido.

6.4.15.8 El medio TPGY es relativamente estable y puede mantenerse hasta 2-3 semanas en refrigeración.

6.4.15.9 Los medios a base de carne cocida deben agitarse en vórtex, debido a que la toxina puede adherirse a las partículas de carne.

6.4.15.10 No es necesario filtrar la tripsina. Preparar 1 g en 10 mL de agua destilada. Esta solución puede mantenerse hasta 1 semana en refrigeración.

6.4.16 Reglas de bioseguridad en el laboratorio de *C. botulinum*.

6.4.16.1 Colocar señalamientos de riesgo biológico. Restringir la entrada y mantener en el laboratorio a un número mínimo de personal.

6.4.16.2 Todo el personal debe utilizar bata y lentes de seguridad.

6.4.16.3 Utilizar solución de hipoclorito de sodio al 1% para limpiar superficies de las mesas, antes y después de su uso.

6.4.16.4 Nunca pipetear con la boca. Utilizar propipetas.

6.4.16.5 Usar gabinetes de seguridad para manipular material tóxico.

6.4.16.6 Centrifugar material tóxico en centrífugas herméticas, adaptadas con vasos de seguridad.

6.4.16.7 Transportar todo el material tóxico al autoclave y verificar que se esterilice inmediatamente.

6.4.16.8 El personal no debe trabajar solo en el laboratorio o en el área de animales.

6.4.16.9 Tener disponible un lavaojos y lavamanos de pedal.

6.4.16.10 Mantener en un lugar visible, los números telefónicos del hospital o médico que tengan antitoxina de uso terapéutico para casos de emergencia.

6.4.16.11 Reducir al mínimo el espacio donde se coloque el material y equipo para uso exclusivo.

6.4.17 Expresión de resultados

6.4.17.1 Comparar los resultados obtenidos conforme a lo señalado en el cuadro 1:

Cuadro 1

Algunas características de *C. botulinum* grupos I y II.

Grupo	Tipo*	Activación con tripsina	Esporas resistentes al calor (75°C/20 min.)	Crecimiento por abajo de 10°C	Temperatura de crecimiento y producción de toxina.
I	A,B, F ^b	±	+	-	30 - 37°C

II	B ^c ,E,F ^b	+	-	+	26 - 30° C
----	----------------------------------	---	---	---	------------

* Algunas cepas de los tipos A y B pueden presentar subtipos A-B, A-F. B-A. B-F, cada una produce una toxina en mayor cantidad (representada por la primera letra del subtipo).

b No común

c No común en Norteamérica

6.4.17.2 Alimento tóxico significa que el alimento cuando se consume, sin someterse a un proceso térmico puede causar botulismo.

6.4.17.3 El hecho de encontrar células vegetativas de *C. botulinum*, no es prueba de que el alimento en cuestión cause botulismo.

6.4.17.4 Es necesaria la presencia de toxina botulínica en el alimento para que se presente un brote.

6.4.17.5 Los microorganismos ingeridos pueden encontrarse en el conducto digestivo; pero no ser capaces de multiplicarse y producir toxina "in vivo" excepto en niños.

6.4.17.6 La presencia de toxina botulínica o de microorganismos en productos enlatados de baja acidez (o pH arriba de 4,6), es indicio de que el proceso térmico fue defectuoso o hubo una contaminación posterior por fracturas en las latas.

- Es más factible que latas abombadas contengan toxina botulínica que latas aplanadas, debido a que el microorganismo produce gas durante su crecimiento.
- La presencia de toxina en latas aplanadas puede deberse a una cierre defectuoso, suficiente para que el gas producido se escape.
- La toxina botulínica en productos enlatados es del tipo A o las cepas proteolíticas tipo B, debido a que las esporas de los proteolíticos se encuentran entre las más resistentes al tratamiento térmico.
- Las esporas de cepas no proteolíticas, tipos: B, E y F generalmente son menos resistentes al calor y no podrían sobrevivir aun en tratamientos a bajas temperaturas.

6.4.17.7 La protección de los ratones, en la prueba, con una de las antitoxinas, confirman la presencia de toxina botulínica y determina el tipo de toxina presente en una muestra.

6.4.17.8 Las muertes que se presentan en ratones protegidos por una de las antitoxinas monovalentes, se pueden explicar por las siguientes razones:

- Puede haber mucha toxina en la muestra.
- Puede existir más de un tipo de toxina.
- Las muertes pueden deberse a otras causas.

Nota: En cualquier caso, se requiere hacer diluciones más altas del fluido tóxico y probar con mezclas de antitoxinas, en lugar de monovalentes.

Es posible que existan otros materiales tóxicos resistentes al calor, los cuales pudieran ser responsables de las muertes; tanto en muestras sin calentar como calentadas.

Las sustancias tóxicas resistentes al calor, podrían enmascarar a la toxina botulínica.

6.4.18 Informe de la prueba

Ausencia o presencia de <i>C. Botulinum</i> Toxina botulínica negativa o positiva
--

6.5 Determinación de enterotoxina estafilocócica por el método de ELISA

6.5.1 Principio del método.

Este método se basa en un inmunoensayo visual el cual proporciona una prueba rápida (4 h), sensible (1,0 ng o más por mL o g), y específica para la identificación de las enterotoxinas estafilocócicas A-E. Sin embargo, con esta prueba no se identifican los serotipos de enterotoxina, en forma individual. La prueba de ELISA se realiza en configuración de "sandwich".

6.5.2 Equipo.

6.5.2.1 Equipo comercial de ELISA.

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

6.5.2.3 Omnimixer, licuadora (o equivalente) para la preparación de los extractos de alimentos.

6.5.2.4 Centrífuga a 1000 -3000 x g.

6.5.2.5 Agitador de microplacas (opcional).

6.5.2.6 Lector de microplacas (opcional).

6.5.2.7 Balanza con una sensibilidad de 0,1 g.

6.5.3 Materiales.

6.5.3.1 Algodón absorbente.

6.5.3.2 Micropipetas de 50-200 μL y 5-20 μL .

6.5.3.3 Puntas de plástico para micropipeta.

6.5.3.4 Plástico para envolver o sellar recipientes de plástico.

6.5.3.5 Papel pH (intervalo 0-14).

6.5.3.6 Frascos de plástico de 500 mL.

6.5.3.7 Jeringas de plástico de 25 mL.

6.5.3.8 Tubos para centrífuga.

6.5.3.9 Tubos de polipropileno de 12 x 75 mm.

6.5.3.10 Polietilen glicol (PEG, peso molecular de 15,000-20,000).

6.5.3.11 Tubo de diálisis (12 000-14 000 peso molecular exclusión).

6.5.3.12 Vasos de precipitados de 250 mL.

6.5.3.13 Filtros tipo jeringa (para filtrar los alimentos). Preparar jeringas de plástico desechables (0,25 mL) e insertar suficiente cantidad de algodón absorbente, para hacer un empaque de 0,5 cm. Pasar 5,0 mL de agua destilada, presionar con el émbolo para asegurarse de formar un paquete firme. Preparar inmediatamente antes de filtrar los extractos de alimento, para tratar con el aditivo provisto con el equipo.

6.5.3.14 Placa de 48 o 96 pozos recubiertos con el grupo de antisueros *.

6.5.3.15 Soporte para sostener la placa *.

6.5.3.16 Instructivo del método *.

6.5.3.17 Comparador de color *.

6.5.3.18 Hoja de resultados *.

* Materiales suministrados por el fabricante.

6.5.4. Reactivos.

Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y para efectos de este método por agua se entiende agua destilada.

6.5.4.1 Solución amortiguadora Tris 0,25 M (30,28 g TRIS/L, pH 8,0).

6.5.4.2 Solución de hidróxido de sodio 1,0 N (NaOH).

6.5.4.3 Acido clorhídrico (HCl).

6.5.4.4 Agua destilada o deionizada.

6.5.4.5 Hipoclorito de sodio.

6.5.4.6 BHI con 0,7% de agar (m/v).

6.5.4.7 Solución de lavado*

Contiene: 1.5 g de tris (hidroximetil) aminometano (Tris), 6g de NaCl, 2.0 g monolaurato de sorbitán polioxietilenado (Tween 20), y 0.001 g de timerosal en 25.0 mL de H₂O.

6.5.4.8 Aditivo para la muestra*

Es una solución que contiene: 2 g de Tween 20 y 0,001 g de timerosal en 6,0 mL de H₂O.

6.5.4.9 Control positivo*:

Diluir 25 µL de control positivo concentrado (toxina estafilocócica tipo B, 0,1 g Na₂B₄O₇, 0,1 g de NaCl y 0,001 g de timerosal en 4,0 mL de H₂O), en 2,5 mL de sol. de lavado preparada conforme a lo señalado en el numeral 6.5.4.7.

6.5.4.10 Control negativo*

Contiene: 0,0072 g de Tris, 0,1 g de NaCl, 0,001 g de timerosal y 0,01 g de Tween 20 en 6,0 mL de H₂O.

6.5.4.11 Diluyente del conjugado*.

Contiene: 0,2 g Na₂B₄O₇, 0,1 g de NaCl, 0,1 g de gelatina, y 0,001 g de timerosal en 13,5 mL de H₂O.

6.5.4.12 Conjugado liofilizado*.

Un frasco que contiene antisuero polivalente (A-E) liofilizado, conjugado; 0,003g de Na₂B₄O₇, 0,002 g de CaCl₂, y 0,0001 g de timerosal. Para su uso, agregar al frasco 13 mL del diluyente preparado conforme a lo establecido en el numeral 6.5.4.11.

6.5.4.13 Diluyente del sustrato*.

Cada 26 mL de H₂O, contienen; 0,2 g de ácido acético y 0,01 g de H₂O₂.

6.5.4.14 Sustrato*.

Un frasco de liofilizado que contiene; 0,01 g de 2,2'-di-azino(sulfonato de 3-etil benzotiazolin), 0,01 g de EDTA, y 0,1 g de NaH₂PO₄. Para su uso, agregar al frasco 26 mL del diluyente preparado conforme a lo establecido en el numeral 6.5.4.11.

6.5.4.15 Solución para detener la reacción (solución stop) *.

Cada 6,0 mL contienen; 1,5 g de NaF en 6.0 mL de agua.

* Reactivos suministrados por el fabricante.

6.5.4.16 Reconstitución de la solución de lavado.

Diluir, en un frasco de reactivos la solución concentrada (como lo indique el fabricante), con agua destilada o deionizada, para obtener un volumen de 2 L. Utilizar esta "solución de lavado" para lavar los pozos y diluir el control positivo. Es recomendable el uso de pizeta. Almacenar a 4°C, cuando no se use.

6.5.4.17 Preparación del conjugado

Agregar el diluyente del conjugado y rehidratar a temperatura del laboratorio. Mezclar suavemente. Esta preparación es el "conjugado reconstituido".

6.5.4.18 Preparación del sustrato.

Disolver el sustrato con el diluyente preparado como se describe en el numeral 6.5.4.11 y asegurarse que el contenido se haya disuelto completamente. Dejar a temperatura ambiente antes de su uso.

6.5.5. Preparación de las muestra.

6.5.5.1 Leches fluidas y deshidratadas.

Pesar 25 g de leche deshidratada y agregar 125 mL de solución Tris 0,25 M pH 8,0 (de conformidad con el numeral 6.5.4.1.). Continuar como se indica para leche fluida. En muestras de 5,0 mL, verificar que el pH esté en un intervalo de 7,0-8,0. Agregar 50 µL de aditivo (preparado conforme al numeral 6.5.4.7). En el caso de extractos más claros, ajustar el pH a 4,0 con HCl concentrado. Para muestras de leche de 50 mL, verificar que el pH esté en un intervalo de 7,0-8,0. Agregar 50 µL de aditivo. Centrifugar la muestra 10 min a 1000-3000 x g. Decantar el extracto y pasar 5,0 mL aproximadamente, a través de una jeringa empacada con algodón absorbente humedecido previamente, y recibir en un tubo de polipropileno. Ajustar nuevamente el pH a 7,0 - 8,0 (usar papel pH). Agregar 50 µL de aditivo y mezclar.

6.5.5.2 Ingredientes deshidratados.

Agregar 125 mL de solución Tris 0,25 M pH 8,0, a 25 g de muestra y homogeneizar en licuadora (a alta velocidad) durante 3 min. Centrifugar la muestra 10 min a 1000-3000 x g y recoger el extracto (sobrenadante). Quitar el émbolo de la jeringa de plástico que contiene el empaque de algodón absorbente previamente humedecido y con cuidado pasar el extracto a través del empaque y recibir el eluido. Tomar 5,0 mL de eluido y ajustar el pH a 7,0 - 8,0. Agregar 50 µL de aditivo y mezclar.

6.5.5.3 Quesos.

Agregar 50 mL de agua a 25 g de muestra y homogeneizar en licuadora durante 3 min a alta velocidad. Ajustar con HCl concentrado, a pH 4 (usar papel pH). Centrifugar la muestra durante 10 min a 1000-3000 x g. Quitar el émbolo de la jeringa de plástico que contiene el empaque de algodón absorbente previamente humedecido, y pasar 5 mL del extracto a la jeringa. Insertar el émbolo y con cuidado pasar el extracto a través del empaque y recibir el eluido. Tomar 5 mL del eluido, y agregar solución de NaOH para ajustar a pH 7,0 - 8,0. Agregar 50 µL de aditivo y mezclar.

6.5.5.4 Otros alimentos.

Agregar 50 mL de solución Tris 0.25 M pH 8,0 a 25 g de muestra y homogeneizar en licuadora durante 3 min a alta velocidad. Centrifugar la muestra durante 10 min a 1000-3000 x g. Quitar el émbolo de la jeringa de plástico que contiene el empaque de algodón absorbente previamente humedecido y pasar 5 mL de extracto a la jeringa. Insertar el émbolo y con cuidado pasar el extracto a través del empaque y recibir el eluido. Tomar 5 mL del eluido, ajustar a pH 7,0 - 8,0 si es necesario. Agregar 50 µL de aditivo y mezclar.

Nota 1: Preparar los extractos de alimentos inmediatamente antes de realizar la prueba.

6.5.6 Precauciones generales

6.5.6.1 En el caso de alimentos crudos fermentados, procesados o enlatados con defectos evidentes o, de cultivos fluidos obtenidos en el laboratorio, que pudieran dar como resultado el desarrollo de microorganismos productores de peroxidasa, es necesario, antes de efectuar la determinación de toxina, verificar si estos extractos o preparados a partir contienen peroxidasa, debido a que esta enzima podría interferir con la interpretación de los resultados.

6.5.6.2 Para determinar la presencia de peroxidasa, agregar 50 µL del sustrato (preparado de conformidad con lo establecido en el numeral 6.5.4.13), en una placa de microtitulación sin tratar (no contiene anticuerpos para la enterotoxina estafilocócica). Dejar en reposo 10 min. Si el color cambia a azul o azul-verdoso, esto indica que la muestra contiene peroxidasa intrínseca; la cual debe inactivarse. Si la muestra permanece incolora (o con el color original), realizar el análisis de enterotoxina. Para inactivar la peroxidasa intrínseca, preparar una solución al 30% (m/v) de azida de sodio y agregar 1 mL de esta solución a 4 mL de muestra (la concentración final de la azida de sodio es de 6% m/v). Mezclar y agregar un poco de aditivo (preparado conforme a lo establecido en el numeral 6.5.4.3), dejar en reposo 1-2 min a temperatura ambiente (20-25°C). Repetir la prueba para determinar presencia de peroxidasa, como se describió anteriormente. Si la reacción es incolora o presenta el color original, continuar con la prueba.

6.5.6.3 Desechar los materiales que contienen azida de sodio, de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio.

6.5.6.4 Para alimentos crudos (ejemplo: verduras), seguir las precauciones generales señaladas anteriormente.

6.5.6.5 Observar la fecha de caducidad del equipo adquirido ya que es la última fecha en la cual el producto debe utilizarse. Preparar todos los reactivos con cuidado y anotar la fecha de reconstitución en la etiqueta externa de la caja. Usar los reactivos dentro de los 65 días a la fecha anotada en la etiqueta. Refrigerar todos los componentes (2-8°C), cuando no estén en uso. NO CONGELAR.

6.5.6.6 El equipo de inmunoensayo visual, está preparado para utilizarse como una unidad integral. Por lo tanto, no se deben mezclar los componentes de diferentes lotes.

6.5.6.7 Utilizar puntas nuevas para cada muestra de alimento. Evitar la contaminación cruzada al llenar los pozos. Si se usan propipetas de plástico para distribuir el conjugado y el sustrato, se deben mantener siempre por separado. Asegurarse de no confundir las tapas de los reactivos.

6.5.6.8 Usar controles positivos y negativos en cada prueba.

6.5.6.9 Preparar recipientes con solución de hipoclorito de sodio al 2% para desechar todas las muestras y materiales que contengan toxina.

6.5.6.10 Mantener dentro del paquete los pozos removibles que no se usen, y volver a sellar con cinta después de cada uso.

6.5.7 Determinación de la enterotoxina

6.5.7.1 Preparación de los pozos.

Tomar del paquete el número necesario de pozos; uno para cada muestra, uno para control positivo y uno para control negativo. Si se requiere, pueden utilizarse pozos adicionales (control positivo y negativo en alimento).

6.5.7.2 Prelavado

Con la ayuda de una pizeta, llenar cada pozo con solución de lavado y dejar en reposo durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Vaciar los pozos por inversión rápida del soporte (placa) y eliminar completamente todo residuo de líquido, golpeando varias veces firmemente hacia abajo la placa sobre una toalla de papel absorbente.

6.5.7.3 Colocación de las muestras

Pasar alícuotas de 200 μL de los controles y muestras (extractos de alimento o de cultivos) dentro de pozos individuales. Anotar la posición de cada muestra en la hoja de registro específica. Golpear suavemente la placa para asegurar una distribución homogénea y el contacto de las muestras con las paredes de los pozos. El uso de un agitador de microplacas durante 30 segundos, es opcional. Cubrir los pozos con una película plástica, estirable, autoadherible o sello especial de microplacas; para evitar la evaporación. Incubar a 35-37°C durante 2 h.

6.5.7.4. Segundo lavado.

Presionar firmemente los pozos en la placa e invertir rápidamente. Vaciar el contenido de los pozos en el recipiente de desecho (con hipoclorito de sodio al 2%). Eliminar el residuo de líquido golpeando enérgicamente, varias veces la placa invertida, sobre una toalla de papel absorbente; llenar completamente los pozos con solución de lavado y repetir el lavado en la misma forma, de 2 a 3 veces más y finalmente, vaciar los pozos.

Nota 2: El lavado profundo de los pozos, es un paso crítico dado que asegura una clara interpretación de los resultados.

6.5.7.5 Adición de conjugado

Agregar 200 μL del conjugado reconstituido (enzima), a cada pozo. Volver a cubrir la placa e incubar 1 h a temperatura ambiente. Vaciar las placas y lavar profundamente 5 veces, como se describió anteriormente.

6.5.7.6 Adición del Substrato

Agregar a cada pozo 200 μL del sustrato reconstituido. Dejar a temperatura ambiente durante 30 min como mínimo, hasta que el control positivo alcance la máxima absorbancia (mayor a 1,0) o a un color más intenso que el número 4 del comparador de color. El desarrollo de color tiende a concentrarse alrededor de las orillas de los pozos. Para obtener resultados más precisos, golpear con suavidad los extremos de la placa, con el propósito de que el contenido de los pozos se mezcle bien antes de la lectura. Agregar a cada pozo 20 μL de solución stop. Golpear con suavidad para mezclar los contenidos.

Determinar los resultados visualmente o mediante un lector de microtitulación.

6.5.8 Interpretación de los resultados:

Colocar la placa que sostiene los pozos sobre un fondo blanco. Comparar el color de cada pozo con el comparador de color. El control positivo de toxina (y el control positivo de alimento, si se usó) deben producir un color verde intenso, lo que indica que todos los reactivos han funcionado. Si el control negativo es significativamente más oscuro que el representado en el comparador de color, significa que hubo probablemente, un lavado inadecuado y la prueba debe repetirse.

La muestra se considera positiva, si cumple los siguientes criterios:

- El control negativo está dentro del intervalo de color negativo, representado en el comparador de color, y
- Las muestras presentan un color verde (o azul) más oscuro que el intervalo negativo representado en el comparador de color.

La prueba de enterotoxina se considera negativa si se cumplen los siguientes criterios:

- El control negativo está dentro del intervalo de color negativo, representado en el comparador de color, y
- La muestra es incolora o tiene el color dentro del intervalo negativo representado en el comparador de color.

6.5.9 Expresión de resultados.

7. Concordancia

Esta norma no tiene concordancia con normas internacionales.

8. Bibliografía

- 8.1** Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1992. Ley Federal sobre Metrología y Normalización. **Diario Oficial de la Federación**. México, D.F.
- 8.2** Secretaría de Salud. 1991. Ley General de Salud. **Diario Oficial de la Federación**. México, D.F., y sus reformas de 1997.
- 8.3** Secretaría de Salud. 1999. Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios. **Diario Oficial de la Federación**. México, D.F.
- 8.4** Amador L.R. y col. 1993. Manual de Laboratorio de Microbiología Sanitaria. IPN-ENCB. 2a. Edición. pp. 139-153.
- 8.5** American Public Health Association. 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 5th edition. APHA, Washington. D.C.
- 8.6** Bacteriological Analytical Manual. 2001. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/>
- 8.7** Billie, J & M.P. Doyle. 1981. *Listeriae* and *Erysipelothrix*. Manual of Clinical Microbiology, 5th ed. A. Ballows W. J. Hausler Jr, K.L. Herman, H.D. Isenberg, and J.J. Shadomy (Eds). American Society for Microbiology, D.C. pp. 287 a 295.
- 8.8** Escartín Fernández E. 2000. Microbiología e inocuidad de los alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro.
- 8.9** Ewing, W.H. y Ewing's. 1986. Identification of Enterobacteriaceae. 4th Edition. Elsevier. New York.
- 8.10** Jones, D. & Seeliger PRR. 1992. Genus *Listeria*. Edith Balows H. Truper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.H. The Prokariotes, New York: Springer-Verlag. P. 1595-1615.
- 8.11** Jones, D., & H.P.R. Seeliger. 1986. International Committee on Systematic Bacteriology. Subcommittee on the taxonomy on *Listeria* and related bacteria (minutes of meeting. Nantes, France, Sep 1985) In J. Syst. Bacteriol. 36: p. 117-118.
- 8.12** Manual Difco. 1984. Medios de cultivo deshidratados y reactivos para microbiología. Laboratories. Detroit Michigan USA. Décima edición. pp. 765, 946, 1042, 1044 y 1128.
- 8.13** Miller, A.J., J.L. Smith & G.A. Somkuti. 1990. Foodborne Listeriosis. Elsevier Science Publishers. Amsterdam-New York-Oxford.
- 8.14** Norma ISO 4831-2a. 1991. Microbiology General Guidance for Enumeration of Coliforms. Most Probable Number Technique. International Organization for Standardization.
- 8.15** Norma ISO 4832. 1991. Microbiology General Guidance for Enumeration of Coliforms. Colony Count Technique. International Organization for Standardization.
- 8.16** Norma ISO 6579. 1990. Microbiology General Guidance on Methods for detection of *Salmonella*. International Organization of Standardization. Second edition.
- 8.17** Norma ISO 6887-1983 (E). Microbiology General Guidance for the preparation of dilutions for microbiological examination. International Organization for Standardization.
- 8.18** Norma ISO 7954. 1987. Microbiology. General Guidance for Enumeration of Yeast and Moulds Colony Technique at 25 °C. International Organization for Standardization.
- 8.19** NORMA-Z-013/02. 1981. Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas. (Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.)
- 8.20** Norma-Z-013/02. 1981. Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas (Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.)
- 8.21** Official Methods of Analysis. 1995. Washington D.C. U.S.A.
- 8.22** Poelma L.P. y Silliker H.J. 1984. *Salmonella*; Compendium of Methods for the Microbiology Examination of Foods. Second Edition. American Public Health Association. Washington, D.C. p.p. 301-328.
- 8.23** Rocourt, J. & P.A. Grimont. 1983. *Listeria welshimeri*, sp. Nov., and *Listeria seeligeri*, sp. Nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 33: p. 866-869.
- 8.24** Secretaría de Salud. 1989. Manual de técnicas y procedimientos para análisis microbiológico para productos cárnicos. México, D.F., pp. 15-24 y 28-30.

8.25 Secretaría de Salud. 1992. Manual de técnicas y procedimientos para análisis microbiológicos de leche en polvo. México, D.F., pp. 11-18.

8.26 Seeliger, H.P.R., & D. Jones. 1986. *Listeria*. In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Vol. 2, 9 th Ed. P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (eds). Williams & Wilkins, Baltimore. pp. 1235-1245.

8.27 Seeliger, H.P.R., J. Rocourt, A. Schrettenbrunner, P.A.D. Grimond, & D. Jones. 1984. *Listeria ivanovii* sp. Nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 34: p. 336-337.

8.28 Stuart, S.E., & H.J. Welshimer. 1974. Taxonomic reexamination of *Listeria pirie* and transfer of *Listeria gragy* and *Listeria murrayi* to a new genus *Murraya*, Int. J. Syst. Bacteriol, 24: p. 177-185.

8.29 Vanderzant F., Carland S., y Don F. 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association. Washington, D.C.

8.30 Warburton, D.W., J.M. Farber. A. Armstrong, R. Cadeira, N.P., Tiwari, T. Babluk , P. Lacasse & S. Read. 1991. A Canadian comparative study of modified versions of the "FDA" & "USDA" methods for detection of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 54: p. 669-676.

9. Observancia de la norma

La vigilancia del cumplimiento de la presente norma corresponde a la Secretaría de Salud, a los gobiernos de las entidades federativas, en el ámbito de sus respectivas competencias, y a los organismos de tercera parte habilitados para tal efecto.

México, D.F., a 20 de diciembre de 2002.- El Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, **Ernesto Enríquez Rubio**.- Rúbrica.