

L-Manuals T-IV

Análisis microbiológico mediante métodos de prueba de aguas y alimentos

Santos-Cervera, M.
Chuc-Sánchez, A.
Ruiz-Hernández, J.
Chan-Keb, C.
Autores



Análisis microbiológico mediante métodos de prueba de aguas y alimentos

Primera Edición

Santos-Cervera, M., Chuc-Sánchez, A., Ruiz-Hernández, J. y Chan-Keb, C

DOI: <https://doi.org/10.35429/PM.2024.1.1.67>

Universidad Autónoma de Campeche



ECORFAN®

Autores

Santos-Cervera, M. PhD.

Chuc-Sánchez, A. PhD.

Ruiz-Hernández, J. PhD.

Chan-Keb, C. PhD.

Editor en Jefe

Vargas-Delgado, Oscar. PhD

Director Ejecutivo

Ramos-Escamilla, María. PhD

Editorial Director

Peralta-Castro, Enrique. MsC

Diseñador web

Escamilla-Bouchan, Imelda. PhD

Diagramador web

Luna-Soto, Vladimir. PhD

Asistente editorial

Trejo-Ramos, Iván. BsC

Filólogo

Ramos-Arancibia, Alejandra. BsC

ISBN: 978-607-8948-34-5

Sello editorial ECORFAN: 978-607-8948

Número de Control PM: 2024-01

Clasificación PM (2024): 311224-0101

©ECORFAN-México, S.C.

Park Pedregal Business 3580 – Adolfo Ruiz Cortines Boulevard, CP-01900. San Jeronimo Aculco Álvaro Obregón - Mexico City.

No part of this writing protected by the Federal Copyright Law may be reproduced, transmitted or used in any form or by any means, graphic, electronic or mechanical, including, but not limited to, the following: Quotations in radio or electronic journalistic data compilation articles and bibliographic commentaries. For the purposes of articles 13, 162,163 fraction I, 164 fraction I, 168, 169,209 fraction III and other relative articles of the Federal Copyright Law. Infringements: Being compelled to prosecute under Mexican copyright law. The use of general descriptive names, registered names, trademarks, or trade names in this publication does not imply, even in the absence of a specific statement, that such names are exempt from the relevant protection in laws and regulations of Mexico and therefore free for general use by the international scientific community. is part of ECORFAN Media [www.ecorfan.org]. Published by ECORFAN-Mexico. All Rights Reserved.

Derivative works: Users may reproduce tables of contents or prepare lists of chapters including abstracts for internal circulation within their institutions or companies. Other than for chapters published under the CC BY license.

Storage or usage: Except as outlined above or as set out in the relevant user license, no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without prior written permission of the publisher.

The Authors. Published by ECORFAN-Mexico, S.C. for its Holding Mexico on behalf of Laboratory Manuals. This is an open access book under the CC BY-NC-ND license [<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>]

Laboratory Manuals

Definición Textbooks

Apoyar a la Comunidad Científica Internacional en su producción escrita de Ciencia, Tecnología e Innovación en las áreas de investigación del CONAHCYT y PRODEP.

ECORFAN-México, S.C. es una Empresa Científica y Tecnológica en contribución a la formación de Recursos Humanos enfocada a la continuidad en el análisis crítico de la Investigación Internacional y está adscrita al RENIECYT del CONAHCYT con el número 1702902, su compromiso es difundir las investigaciones y aportaciones de la Comunidad Científica Internacional, instituciones académicas, organismos y entidades de los sectores público y privado y contribuir a la vinculación de los investigadores que realizan actividades científicas, desarrollos tecnológicos y formación de recursos humanos especializados con los gobiernos, empresas y organizaciones sociales.

Fomentar la interlocución de la Comunidad Científica Internacional con otros centros de estudio en México y en el extranjero y promover una amplia incorporación de académicos, especialistas e investigadores a la publicación seriada en Nichos Científicos de Universidades Autónomas - Universidades Públicas Estatales - IES Federales - Universidades Politécnicas - Universidades Tecnológicas - Institutos Tecnológicos Federales - Escuelas Normales - Institutos Tecnológicos Descentralizados - Universidades Interculturales - Consejos de Ciencia y Tecnología - Centros de Investigación del CONAHCYT.

Alcance, Cobertura y Audiencia

Textbooks es un producto editado por ECORFAN-México S.C. en su Holding con repositorio en México, es una publicación científica arbitrada e indizada. Admite una amplia gama de contenidos que son evaluados por pares académicos mediante el método de doble ciego, sobre temas relacionados con la teoría y la práctica de las áreas de investigación del CONAHCYT y PRODEP respectivamente con diversos enfoques y perspectivas, que contribuyen a la difusión del desarrollo de la Ciencia, la Tecnología y la Innovación que permiten obtener argumentos relacionados con la toma de decisiones e incidir en la formulación de políticas internacionales en el campo de la Ciencia. El horizonte editorial de ECORFAN-México® se extiende más allá de lo académico e integra otros segmentos de investigación y análisis fuera de ese ámbito, siempre y cuando cumplan con los requisitos de rigor argumentativo y científico, además de abordar temas de interés general y actual de la Sociedad Científica Internacional.

Comité Editorial

Montero - Pantoja, Carlos. PhD
Universidad de Valladolid

Martinez - Licona, José Francisco. PhD
University of Lehman College

Molar - Orozco, María Eugenia. PhD
Universidad Politécnica de Catalunya

Azor - Hernández, Ileana. PhD
Instituto Superior de Arte

García - Y Barragán, Luis Felipe. PhD
Universidad Nacional Autónoma de México

Arellanez - Hernández, Jorge Luis. PhD
Universidad Nacional Autónoma de México

Bojórquez - Morales, Gonzalo. PhD
Universidad de Colima

Villalobos - Alonzo, María de los Ángeles. PhD
Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla

Román - Kalisch, Manuel Arturo. PhD
Universidad Nacional Autónoma de México

García, Silvia. PhD
Universidad Agraria del Ecuador

Comité Arbitral

Mercado - Ibarra, Santa Magdalena. PhD
Universidad Marista de México

Chavez - Gonzalez, Guadalupe. PhD
Universidad Autónoma de Nuevo León

De La Mora - Espinosa, Rosa Imelda. PhD
Universidad Autónoma de Querétaro

García - Villanueva, Jorge. PhD
Universidad Nacional Autónoma de México

Cortés - Dillanes, Yolanda Emperatriz. PhD
Centro Eleia

Figueroa – Díaz, María Elena. PhD
Universidad Nacional Autónoma de México

Delgado - Campos, Genaro Javier. PhD
Universidad Nacional Autónoma de México

Hernandez-Padilla, Juan Alberto. PhD
Universidad de Guadalajara

Padilla - Castro, Laura. PhD
Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Lindor, Moise. PhD
El Colegio de Tlaxcala

Cortés, María de Lourdes Andrea. PhD
Instituto Tecnológico Superior de Juan Rodríguez

Bazán, Rodrigo. PhD
Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Meda - Lara, Rosa Martha. PhD
Universidad de Guadalajara

Orozco - Ramirez, Luz Adriana. PhD
Universidad Autónoma de Tamaulipas

Santoyo, Carlos. PhD
Universidad Nacional Autónoma de México

Cesión de derechos

Al enviar un Trabajo Científico a ECORFAN Books, el autor se compromete a no someterlo simultáneamente a la consideración de otras publicaciones científicas. Para ello, el autor deberá cumplimentar el Formulario de Originalidad de su Trabajo Científico.

Los autores firman el Formato de Autorización para que su Trabajo Científico sea difundido por los medios que ECORFAN-México, S.C. en su Holding México considere pertinentes para la divulgación y difusión de su Trabajo Científico, cediendo sus Derechos de Trabajo Científico.

Declaración de Autoría

Indicar el nombre de 1 Autor y un máximo de 3 Coautores en la participación del Trabajo Científico e indicar de manera completa la Afiliación Institucional indicando la Dependencia.

Identificar el nombre de 1 Autor y máximo 3 Coautores con el número de CVU - PNPC o SNI-CONAHCYT - indicando el nivel de investigador y su perfil de Google Scholar para verificar su nivel de citación e índice H.

Identificar el Nombre de 1 Autor y 3 Coautores máximo en los Perfiles de Ciencia y Tecnología ampliamente aceptados por la Comunidad Científica Internacional ORC ID - Researcher ID Thomson - arXiv Author ID - PubMed Author ID - Open ID respectivamente.

Indicar el contacto para correspondencia con el Autor (Mail y Teléfono) e indicar al Investigador Colaborador como primer Autor del Trabajo Científico.

Detección de Plagio

Todas las Obras Científicas serán testeadas por el software de plagio PLAGSCAN si se detecta un nivel de plagio Positivo no se mandará a arbitraje y se rescindirá de la recepción de la Obra Científica notificando a los Autores responsables, reivindicando que el plagio académico está tipificado como delito en el Código Penal.

Proceso de arbitraje

Todos los Trabajos Científicos serán evaluados por pares académicos utilizando el método de Doble Ciego. La aprobación del arbitraje es un requisito para que el Consejo Editorial tome una decisión final que será inapelable en todos los casos. MARVID® es una marca spin-off de ECORFAN® especializada en proveer revisores expertos todos ellos con grado de doctor y distinción de Investigadores Internacionales en los respectivos Consejos de Ciencia y Tecnología y la contraparte de CONAHCYT para los capítulos de América-Europa-Asia-África y Oceanía. La identificación de la autoría deberá aparecer únicamente en una primera página, la cual podrá ser eliminada, con el fin de garantizar que el proceso de arbitraje sea anónimo y abarque las siguientes etapas: Identificación de los Libros ECORFAN con su índice de ocupación de autores - Identificación de Autores y Coautores - Detección de Plagio PLAGSCAN - Revisión de Formularios de Autorización y Originalidad - Asignación al Consejo Editorial - Asignación de la pareja de Árbitros Expertos - Notificación de Dictamen - Pliego de Observaciones al Autor - Paquete de Trabajo Científico Modificado para Edición - Publicación.

Food Microbiology

Environmental Microbiology

Santos-Cervera, Mariana Trinidad^a, Chuc-Sánchez, Aldo Alberto^b, Ruiz- Hernández, Judith^c y Chan-Keb, Carlos Armando^{d*}

Universidad Autónoma de Campeche
Instituto Tecnológico Superior de Champotón

^a Universidad Autónoma de Campeche •  0000-0001-5763-693X •  1082018

^b Universidad Autónoma de Campeche •  0009-0001-1935-5130 •  1149541

^c Instituto Tecnológico Superior de Champotón •  0000-0002-7360-4783 •  243102

^d Universidad Autónoma de Campeche •  0000-0003-3494-9508 •  494719

Keys E-book

- Estandarización de métodos analíticos: La investigación basada en las NOM permite homogeneizar los procedimientos microbiológicos, garantizando la comparabilidad y reproducibilidad de los resultados en diferentes laboratorios y sectores.
- Innovación tecnológica aplicada: Se destacan los avances en técnicas moleculares como la PCR, así como la automatización de procesos analíticos, que optimizan la detección de microorganismos patógenos en muestras de agua y alimentos.
- Desarrollo de métodos específicos para condiciones locales: La investigación incorpora soluciones adaptadas a las condiciones geográficas, climáticas y socioeconómicas de México, mejorando la aplicabilidad de las tecnologías microbiológicas a nivel nacional.
- Mejoras en la seguridad sanitaria: Gracias a la implementación de las NOM, se han logrado avances significativos en la prevención de enfermedades transmitidas por agua y alimentos, fortaleciendo los sistemas de vigilancia epidemiológica.
- Comprensión profunda de las NOM: Conocer y aplicar normas como la NOM-127-SSA1-2021 (agua potable) y NOM-210-SSA1-2014 (métodos microbiológicos en alimentos) es esencial para asegurar la inocuidad alimentaria y la calidad del agua.
- Interoperabilidad de métodos: Los procedimientos descritos en la NOM deben ser compatibles con estándares internacionales (como los de la OMS o la ISO), lo cual facilita la generación de conocimiento aplicable globalmente.
- Capacitación en técnicas avanzadas: La formación en técnicas microbiológicas tradicionales y modernas, como el análisis de coliformes totales o la identificación genética de patógenos, es clave para la transferencia de conocimientos.
- Ética y buenas prácticas de laboratorio (BPL): El cumplimiento de las BPL asegura que los resultados obtenidos puedan ser reconocidos y utilizados en investigaciones a nivel internacional.
- Confiabilidad y precisión de los métodos analíticos: Los métodos descritos en la NOM son precisos y eficaces para la detección de patógenos en agua y alimentos, lo que garantiza la protección de la salud pública.
- Actualización constante de la normativa: La evolución de las técnicas analíticas y los cambios en los perfiles de patógenos requieren la actualización periódica de las NOM para mantener su relevancia y efectividad.
- Importancia de la formación profesional: La correcta aplicación de los métodos microbiológicos exige una capacitación continua de los profesionales para asegurar la calidad de los análisis.
- 4. Contribución a la salud pública y la seguridad alimentaria: La investigación y aplicación de las NOM han demostrado ser fundamentales para la prevención de brotes de enfermedades y la mejora de la calidad de vida en México.

Citación: M. Santos, A. Chuc, J. Ruiz y C. Chan (AA. VV.). Análisis Microbiológico mediante métodos de prueba de aguas y alimentos., México. L-Manuals - © ECORFAN-México, 2024

* Correspondencia del Autor (Correo electrónico: carachan@uacam.mx)

Contenido

Introducción	1
Objetivo General	1
Capítulo I Métodos de prueba para la determinación de indicadores microbiano	2
Método de prueba No. 2. Determinación de Coliformes totales en placa	10
Método de prueba No. 3. Determinación de Mesofílicos aerobios	17
Método de prueba No. 4. Estimación de la densidad microbiana de Coliformes fecales por la técnica del Número Más Probable (NMP)	23
Método de prueba No. 5. Cuenta de mohos y levaduras	34
Capítulo II. Métodos de prueba para la determinación de Patógenos específicos	43
Método de prueba No. 1. Determinación cualitativa de <i>Salmonella</i> spp	44
Método de prueba No. 2. Determinación de densidad microbiana de <i>Escherichia coli</i> por el Número Más Probable (NMP)	58
Método de prueba No. 3. Estimación de la cuenta de <i>Staphylococcus aureus</i>	68
Método de prueba No. 4. Determinación cualitativa de <i>Vibrio cholerae</i>	79
Método de prueba No. 5. Determinación y estimación de la densidad de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	89
Referencias sugeridas	96

Introducción

La microbiología se define como el estudio de los microorganismos (Foddai et al., 2020), seres que no se pueden apreciar a simple vista y los cuales se han ido reconociendo a lo largo del tiempo gracias a las mejoras y las diversas técnicas en microscopía, cultivos, purificación, entre otras. Estas técnicas han impulsado otras áreas como ciencia la bioquímica, genética, medicina, veterinaria y muchas más. En el área de alimentos, la microbiología desempeña un papel fundamental, ya que permite mantener la calidad e inocuidad de los mismos. Es un aspecto clave en el monitoreo y control de la vigilancia sanitaria, apoyándose en las Normas Oficiales Mexicanas y en documentos aprobados por la Comisión Federal de Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS); quienes se encargan de mantener entre los límites permisibles lo que está al alcance de la población y que están contenidos en los documentos antes mencionados. Por lo anterior, la demanda de alimentos de alta calidad ha aumentado de manera constante como respuesta a las presiones del mercado y a otros factores. El concepto de calidad de los alimentos ha evolucionado gradualmente para adaptarse a los cambios en las percepciones de los consumidores, así como a los avances tecnológicos disponibles, con el fin de mejorar la trazabilidad, la seguridad alimentaria y la garantía de calidad. (Djekić et al, 2023).

La capacidad de detectar rápidamente patógenos viables en los alimentos es fundamental por razones de salud pública y seguridad alimentaria. Algunos métodos más actuales están basados en el uso de fagos, y son prometedores en términos de velocidad y sensibilidad de detección; sin embargo, su costo es elevado. En contraste, los métodos tradicionales de detección, basados en medios cultivos, permiten demostrar la viabilidad microbiana, pero tienden a ser laboriosos y requieren mucho tiempo, aunque alcanzan el mismo resultado (Foddai et al, 2020). Sin importar la metodología elegida, la prioridad es prevenir las enfermedades transmitidas por los alimentos causadas por patógenos, siendo este el principal objetivo para la seguridad alimentaria. Por otra parte, para entender mejor el comportamiento bacteriano, la detección eficaz y la inactivación eficiente de bacterias patógenas son actualmente el centro de atención en la investigación de este campo. Se ha propuesto que las bacterias pueden ser inducidas a adoptar un estado viable pero no cultivable (VBNC) bajo tensiones ambientales externas adversas, lo que les impide la formación de colonias visibles durante el cultivo tradicional, aunque permanezcan metabólicamente activos y tóxicas. (Zhang et al, 2023).

Para ello, es significativo que las determinaciones analíticas de los diferentes patógenos específicos e indicadores microbianos sea prioritarios, con el fin de demostrar que la funcionalidad del método empleado es adecuado y que el laboratorio de ensayo cumple con ciertos criterios como el uso de métodos y equipos calibrados y verificados para asegurar la confiabilidad de los resultados. Además, el analista que realiza dichas mediciones debe ser competente, estar capacitado y calificado para desempeñar las funciones asignadas, evaluando también de manera periódica el desempeño técnico del laboratorio. Es importante mantener la consistencia en las mediciones que se efectúan en cualquier otro laboratorio y; contar con procedimientos bien definidos de control y aseguramiento de la calidad (NMX-EC-17025-IMNC-2018). En cada uno de los capítulos contenidos en el presente libro se compilan las metodologías reglamentarias extraídas de las normas mencionadas anteriormente; destacando la determinación de patógenos específicos como la *Salmonella sp.*, inicialmente identificada en muestras clínicas y posteriormente adaptándose metodologías para su detección en alimentos. Su determinación se divide en cuatro etapas; a) pre-enriquecimiento; b) enriquecimiento selectivo; c) aislamiento en medios de cultivos selectivos y diferenciales y, d) la identificación bioquímica y confirmación serológica de los aislados (NOM-210-SSA1-2014). Por otra parte, se incluyen a los denominados indicadores como es el caso de los coliformes, para los cuáles se utilizan actualmente tres grupos (coliformes totales, fecales y *E. coli*) como indicadores de la calidad sanitaria del agua o de las condiciones sanitarias en el procesamiento de alimentos, aplicando el método del Número Más Probable, que se divide en una prueba presuntiva y otra confirmativa (NOM-210-SSA1-2014). Se espera que esta información sirva de guía y apoyo para la correcta aplicación de las metodologías en búsqueda de un buen resultado analítico.

Objetivo General

Proponer un marco de referencia para el procesamiento de las muestras de alimentos (crudos, cocidos, condimentados, etc.) y aguas de uso, consumo, desecho y contacto humano (purificada, potable, residuales, de mar, etc.) que se analizan a nivel microbiológico, utilizando los métodos de prueba establecidos por las Normas Oficiales vigentes para obtener resultados confiables y de calidad.

Capítulo I Métodos de prueba para la determinación de indicadores microbiano

Método de prueba No. 1. Estimación de la densidad microbiana de Coliformes totales por la técnica del Número Más Probable (NMP)

1. Introducción

El método del Número Más Probable (NMP) consiste de una prueba presuntiva y confirmativa. La serie de 5 o 10 tubos se utiliza dependiendo de la contaminación esperada y del grado de exactitud deseado. Se basa en la dilución de la muestra en tubos múltiples o en muestras directas, de tal forma que todos los tubos de la mayor concentración de nutrientes sean negativos. Se basa en la propiedad de los microorganismos Coliformes para producir gas como resultado de la fermentación de la Lactosa y en la mayoría de los casos se acompaña de turbidez en todo el caldo dentro de las 24 a 48 horas de incubación a $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$, manifestándose en las pequeñas campanas Durham.

2. Objetivo

Describir la técnica para estimar la densidad microbiana de Coliformes Totales por la técnica del Número Más Probable (NMP) de bacterias viables en muestras de aguas.

3. Alcance

Este método se aplica estimando el número de Coliformes Totales por medio de la técnica del número más probable (NMP) después de la incubación, especialmente en productos que se encuentran en bajas concentraciones de microorganismos (<10 UFC/g o mL). Se aplica en su mayoría en muestras de Hielo y Aguas de uso y consumo humano: Purificada, Potable, Pozo, Manantial, Uso recreativo.

4. Referencia normativa

NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Apéndice Normativo H. Método aprobado para la estimación de la densidad de Coliformes Totales, Fecales y *E. coli* por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua.

5. Términos y definiciones

- Agua para uso y consumo humano: agua que no contiene contaminantes objetables, químicos o agentes infecciosos y que no causa efectos nocivos para la salud.
- Agua potable: aquella cuyo uso y consumo no causa efectos nocivos al ser humano, para lo cual debe cumplir con los requisitos que establece el Reglamento y la Norma Oficial Mexicana correspondiente.
- Agua purificada: aquella sometida a un tratamiento físico o químico que se encuentra libre de agentes infecciosos, cuya ingestión no causa efectos nocivos a la salud y que además debe cumplir con los requisitos que se establecen en la Norma Oficial Mexicana correspondiente.
- Campanas Durham: se utilizan para determinar la producción de gases en microorganismos.
- Grupo coliforme: bacilos cortos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, sin formación de espora, que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas dentro de las 48h cuando se incuban a 35°C .
- Hielo purificado: envasado (embolsado), aquel que se obtiene a partir de agua purificada que ha sido sometida a proceso de cristalización, cuya ingestión no cause efectos nocivos para la salud, y para su comercialización se presenta embolsado y que además cumple con los requisitos que se establecen.
- Muestra: cantidad de material que posee todas las características físicas, fisicoquímicas y microbiológicas del producto a evaluar.
- Número Más Probable (NMP): término que debe utilizarse para reportar Coliformes.
- Producto a granel: producto que debe pesarse, medirse o contarse en presencia del consumidor al momento de su venta.

6. Materiales, equipos e instrumentos

- Asa de platino de aproximadamente 5 mm de diámetro.
- Batas
- Campanas de fermentación Durham.
- Cubre bocas.
- Gasas.
- Gradillas para tubos de 16 x 150 mm y 25 x 200 mm
- Guantes desechables de látex.
- Pipetas bacteriológicas graduadas de 5 mL, 10 mL y 25 mL y protegidas con tapón de algodón.
- Pipetores.
- Tubos de 16 X 150 mm y 25 x 200mm.
- Vaso de precipitado de 500 mL.
- Enfriador eléctrico de 2-8°C.
- Incubadora que mantenga una temperatura de 35°C + 0.5°C.
- Termómetros de inmersión con división mínima de 0.5°C calibrado y/o verificado.
- Termómetros de inmersión de 22- 55°C con subdivisiones de 0.1°C calibrado y/o verificado.
- Mecheros Bunsen.

Nota: Todo el material que tenga contacto con las muestras se esterilizará en Horno durante 2h a 170-175°C o 1h a 180°C; o en autoclave durante 30 min a una temperatura de 121°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.

7. Reactivos

- Caldo Lauril Sulfato (CLS) de concentración Sencilla, doble o triple (según prueba).
- Caldo Verde Brillante Lactosa Bilis. (CVBLB)

Nota: Los reactivos y medios de cultivo, se preparan según las indicaciones del fabricante.

8. Fase Pre-analítica

8.1 Condiciones ambientales

La prueba se debe realizar a temperatura ambiental entre 18- 27°C y de 50-65% de humedad.

8.2 Preparación de la muestra

Las muestras congeladas deben mantenerse en refrigeración (2-5°C) un máximo de 18h antes de su análisis, sin llegar a la descongelación. Para muestras congeladas originalmente líquido (ejemplo: hielo), fundir por completo en baño de agua de 40- 45°C un tiempo máximo de 15 minutos y homogeneizar agitando vigorosamente.

Homogeneizar la muestra antes de iniciar el proceso, agitando vigorosamente la muestra 25 veces en un arco de 30°C por 7s. Para el caso de los garrafones, rotar sobre la superficie de la mesa para poder lograr una homogenización aceptable.

8.3 Preparación del material de trabajo

a) Procedimiento para agua purificada y hielo.

Se agitará la muestra de manera manual. Se transferirán 20 mL de ella a cada uno de los 5 tubos de 20 x 200 mm los cuales contengan 10 mL de CLS de concentración triple [3].

b) Procedimiento para agua de uso y consumo humano

Transferir 10 mL de la muestra cada a uno de los tubos, siendo un total de 10 tubos de 25 x 200 mm con 10 mL de CLS de concentración doble [2].

c) Procedimiento para agua de uso recreativo

Utilizar 5 tubos de CLS concentración doble [2] para agregar 10 mL, 5 tubos de CLS concentración sencilla para 1 mL y 5 tubos de CLS concentración sencilla para 0,1 mL de muestra respectivamente, hacer diluciones decimales cuando se espere una densidad microbiana alta y considerarlo para el cálculo.

Nota: Verificar que las campanas de fermentación Durham (a, b, c) colocadas en cada uno de los tubos no contengan burbuja antes de meter a incubación

9. Fase analítica

a) Prueba presuntiva

Iniciar según se indica en cada procedimiento ya sea inciso a, b ó c para las muestras a analizar. Incubar los tubos en la estufa a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Examinar a las 24 h y observar si hay formación de gas. Si la formación de gas no se observa en este tiempo, incubar por 24 h más y anotar resultados.

b) Preparación del control

Así mismo correr 3 tubos de CLS simultáneamente con las muestras, uno inoculado con *Enterobacter aerogenes* como control positivo, otro con *Staphylococcus aureus* como control negativo y uno sin inocular como control de esterilidad. Incubar los tubos en la estufa a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Examinar a las 24 h y observar si hay formación de gas. Si la formación de gas no se observa en este tiempo, incubar por 24 h más y anotar resultados.

c) Prueba confirmativa

Partiendo de la lectura preliminar de la prueba anterior, de cada tubo que muestre formación de gas, se tomará una muestra con el asa y se sembrará en un número igual de tubos de bioquímica 16 x 150 mm los cuales contengan 10 mL de CVBLB para la confirmación de organismos Coliformes Totales los cuales contienen en su interior campanas de fermentación Durham. Verificar que estos últimos no contengan burbuja antes de incubar los tubos a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

Examinar a las $24\text{h} \pm 2\text{h}$ y observar si hay formación de gas; al no observarse en este tiempo, incubar por $24\text{h} \pm 2\text{h}$ más y anotar resultados.

10. Fase Post- analítica

a) Desecho de residuos

Se desecharán de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

b) *Lavado de material*

Lavar el material utilizado en la determinación conforme al Procedimiento interno para el Aseguramiento de la Calidad de los Resultados Analíticos.

11. Cálculos

Calcular la densidad microbiana en Número Más Probable de Coliformes totales consultando las tablas correspondientes de acuerdo con la serie de tubos empleados. Para el análisis de resultados, las tablas se encuentran inmersas en la NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores.

12. Interpretación de los resultados

Expresar las unidades en NMP/100 mL para agua. Cuando se obtienen resultados negativos (ausencia de gas en los tubos), informar el límite de detección que corresponde a menos de una vez el valor más bajo del NMP de la tabla utilizada ($<1,1$), que para el caso de las aguas de uso y consumo humano por acuerdo internacional se informa como “No Detectable” o “ND”.

13. Validez de la prueba

El método debe cumplirse con estricto apego a la referencia normativa. Para que la prueba tenga validez deben incluirse cepas de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 o 6538 que sean tomadas de las cepas de referencia por cada lote de muestras procesadas.

14. Medidas de seguridad

- Usar bata de laboratorio, cubre bocas, guantes estériles.
- Verificar que el lugar de trabajo esté limpio.
- Revisar que los reactivos y materiales para el proceso de las muestras estén completos y debidamente identificados.
- Lavarse las manos antes y después del proceso.
- Al término de uso de las cepas de trabajo, se desecharán de a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental- Salud ambiental- Residuos peligrosos biológicos- infecciosos- Clasificación y especificaciones de manejo.
- Descontaminar el material después de su uso de acuerdo a los procedimientos correspondientes.

15. Medidas de control de calidad

- Verificar la funcionalidad del proceso analítico mediante cepas control las cuales deberán demostrar pureza y viabilidad de las mismas.
- Prueba confirmativa: Correr 3 tubos de caldo VB simultáneamente con las muestras; cada uno con *Enterobacter aerogenes* como control positivo y *Staphylococcus aureus* como control negativo y testigo de esterilidad.
- En el control de esterilidad anotar observaciones sólo en caso de presentar algún crecimiento en el medio.
- Lectura y registro de temperaturas de incubación con termómetros calibrados y verificados
- Todos los equipos e instrumentos deberán estar incluidos en un programa de calibración, mantenimiento preventivo y verificación, de acuerdo a las características del equipo.

16. Apéndice

Box 1

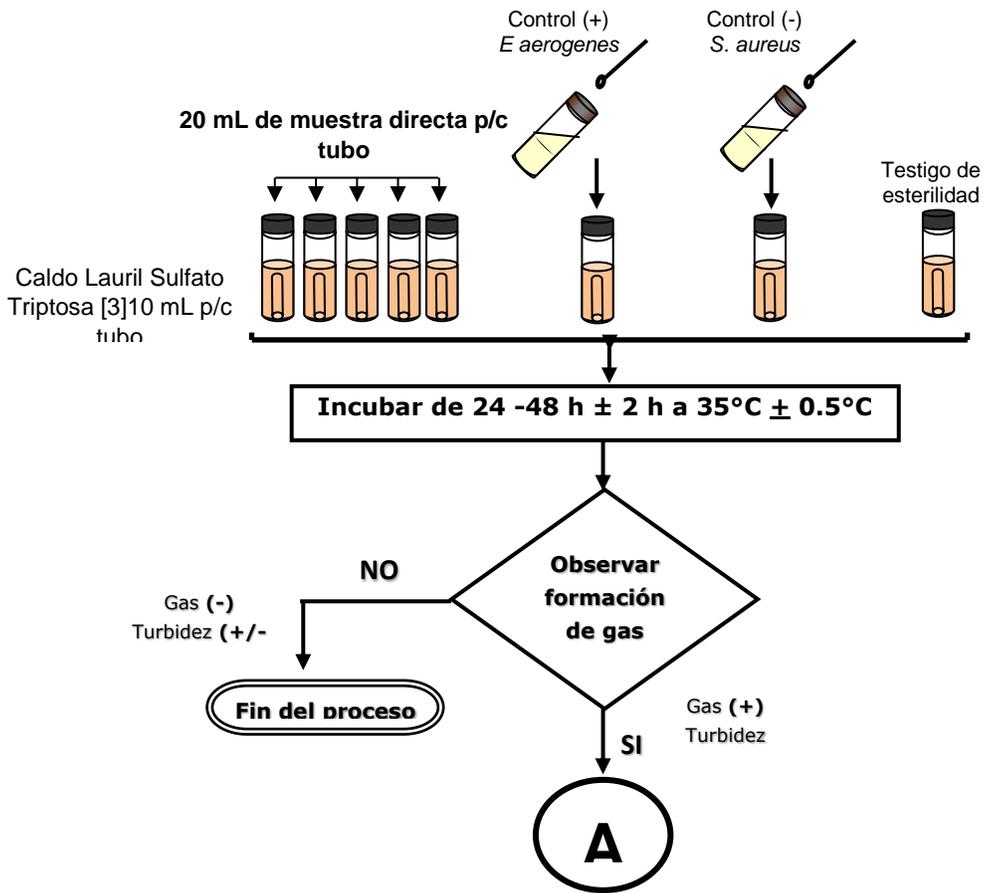


Figura 1

Diagrama para la determinación de coliformes totales para agua y hielo purificado (fase presuntiva)

Fuente: *Elaboración propia*

Box 2

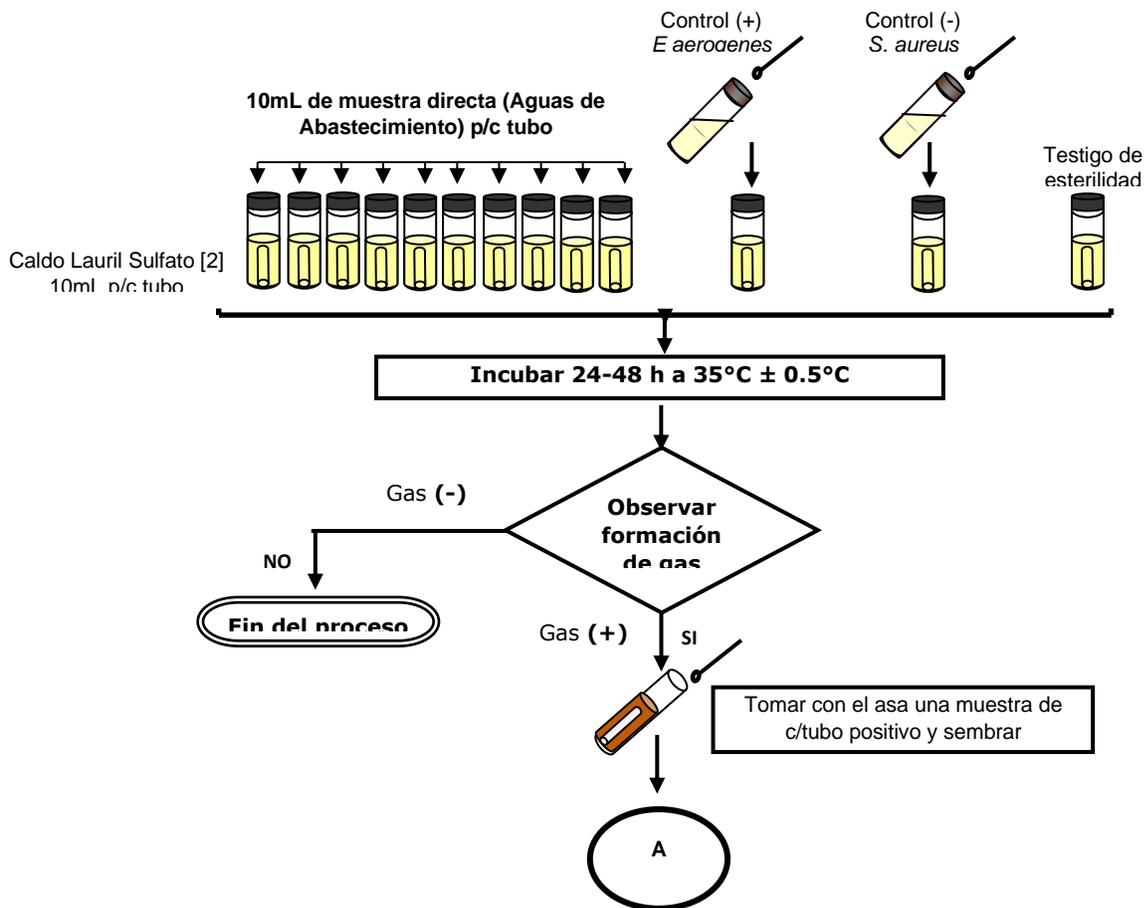


Figura 2

Diagrama para la determinación de coliformes totales para agua de abastecimiento (fase presuntiva)

Fuente: *Elaboración propia*

Box 3

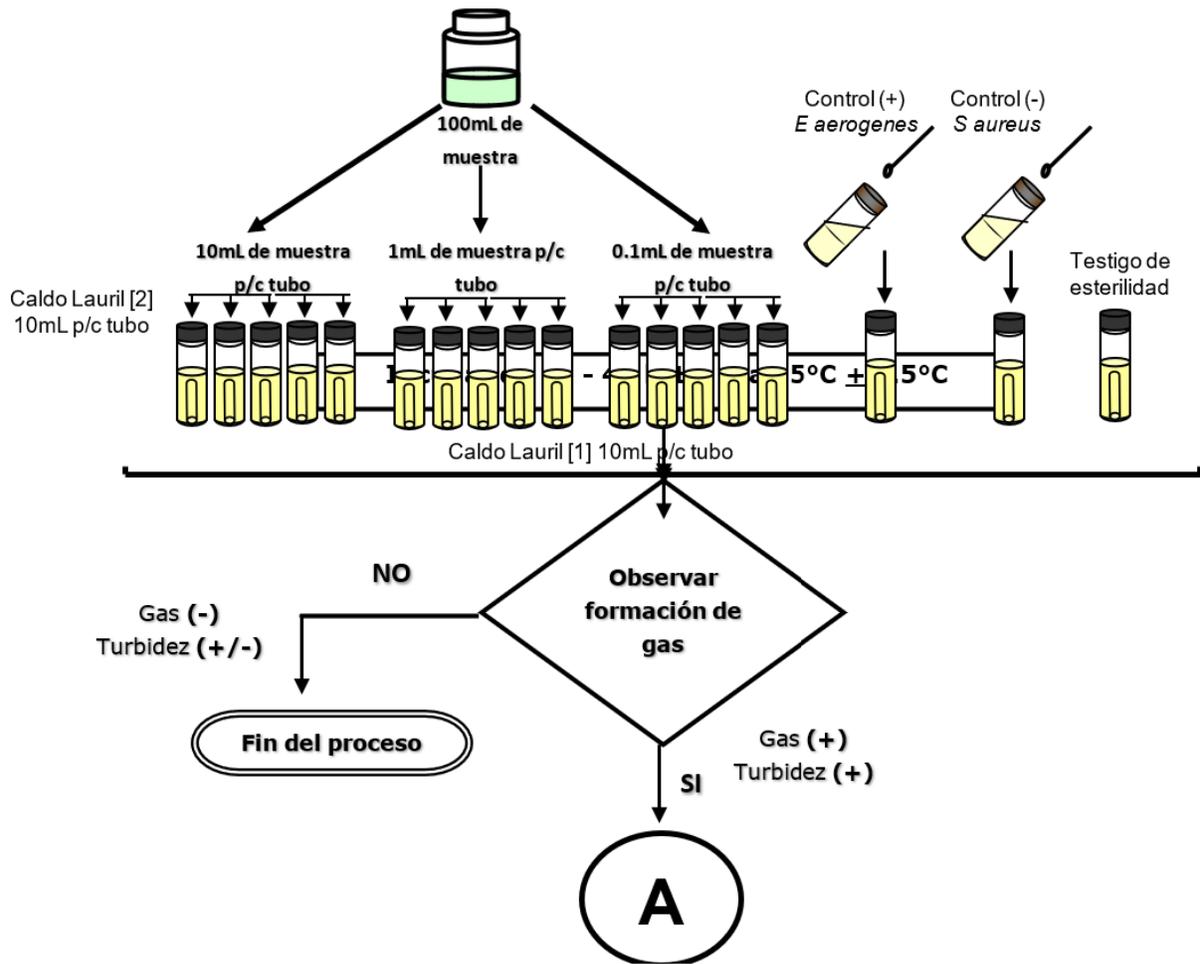


Figura 3

Diagrama para la determinación de coliformes totales para agua de uso recreativo (fase presuntiva)

Fuente: Santos y Ruíz, 2024

Box 4

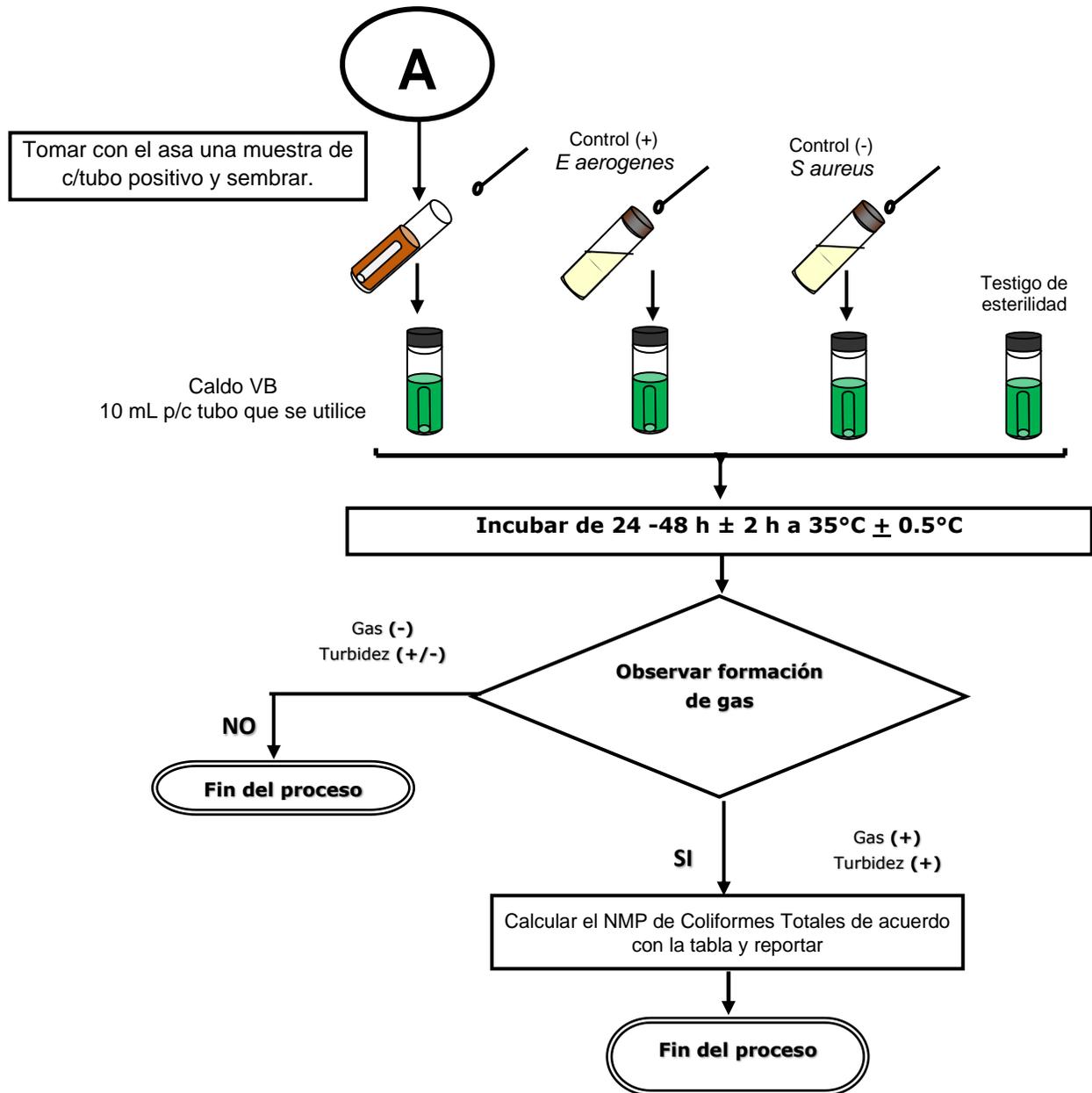


Figura 4

Diagrama de la fase confirmatoria para la determinación de coliformes totales (figuras 1, 2 y 3)

Fuente: Elaboración propia

Método de prueba No. 2. Determinación de Coliformes totales en placa

1. Introducción

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

2. Objetivo

Describir la técnica para determinar la cantidad de Coliformes Totales en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) presentes en alimentos.

3. Alcance

Este método se aplica para determinar el número de microorganismos Coliformes totales presentes en productos alimenticios por medio de la técnica de cuenta en placa. Entre los grupos de interés se encuentran:

- Alimentos preparados (cocidos, salsas cocidas y ensaladas).
- Productos Lácteos y pasteurizados.
- Aguas Preparadas ácidas y neutras.
- Superficie vivas e inertes.
- Otros (masa, tortilla, pan y galleta).

4. Referencia normativa

NOM-113-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos Coliformes totales en placa.

Se complementa con:

- NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
- NOM-110-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- NOM-092-SSA1-1994 Bienes y Servicios Método para la cuenta de Bacterias aerobias en placa.

5. Términos y definiciones

- Grupo coliforme: bacilos cortos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, sin formación de spora, que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas dentro de las 48h cuando se incuban a 35°C.
- Muestra: cantidad de material que posee todas las características físicas, fisicoquímicas y microbiológicas del producto a evaluar.
- Sales biliares: son las sales de los ácidos biliares, pueden ser sales sódicas o potásicas.
- UFC: término que debe utilizarse para reportar las Unidades Formadoras de Colonias presentes en las placas de agar.

6. Materiales, equipos e instrumentos

- Balanza Analítica Digital.
- Baño de agua con cubierta que mantenga una temperatura de 45°C.
- Contador de colonias.
- Enfriador eléctrico de 2- 8 °C.
- Homogeneizador peristáltico (Stomacher)
- Incubadora que mantenga una temperatura de 35°C + 1°C.
- Mecheros Bunsen.
- Termómetros de Líquido en vidrio de 20-50°C y de -5-20°C. calibrado y/o verificado.
- Asas desechables de aproximadamente 1 mm de diámetro.
- Batas
- Bolsas de Stomacher
- Cajas de Petri estériles de 15 X 100 mm de plástico o vidrio
- Cubre bocas.
- Gasas.
- Gradillas para tubos de 16 x 150 mm
- Guantes desechables de látex.
- Pipetas bacteriológicas graduadas de 5 mL y 10 mL protegidas con tapón de algodón.
- Pipetores.
- Tubos de 16 X 150mm.
- Vaso de precipitado de 500 mL.
- Utensilios como tenedores, cucharas, cuchillos y/o bisturí.

Nota: Todo el material que tenga contacto con las muestras se esterilizará en Horno durante 2h a 170-175°C o 1h a 180°C; o en autoclave durante 30 min a una temperatura de 121°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.

7. Reactivos

- Solución reguladora de fosfatos (Buffer).
- Agar Rojo Violeta Bilis Lactosa (ARVBL).

Nota: Los reactivos y medios de cultivo se preparan según el fabricante.

8. Fase Pre-analítica

8.1. Condiciones ambientales

La prueba se debe realizar a temperatura ambiental entre 18- 27°C y de 50-65% de humedad.

8.2. Preparación de la muestra

Verificar que el lugar de trabajo esté limpio, todos los reactivos y material para el proceso de las muestras este completo y debidamente identificado.

Las muestras congeladas deben mantenerse en refrigeración (2-5°C) un máximo de 18 h antes de su análisis, sin llegar a la descongelación.

Para muestras congeladas de un alimento originalmente líquido o licuable (ejemplo: saborines, bolis, paletas), fundir por completo en baño de agua de 40- 45°C un tiempo máximo de 15 minutos y homogeneizar agitando vigorosamente la muestra 25 veces en un arco de 30° por 7s

8.3. Preparación del material de trabajo.

Para el caso del ARVB estar previamente fundido.

9. Fase analítica

a) *Determinación de coliformes totales en placa (UFC)*

Se pesa una cantidad de 10 g de la muestra por analizar en un recipiente de tamaño adecuado el cual contiene un volumen de 90 mL del diluyente llevado a una temperatura similar a la de la muestra.

Se opera en el Stomacher de 1 - 2 min; hasta obtener una suspensión completa. Esta se considera la dilución 10^{-1} . En caso de hacer otras pruebas donde se realice dilución de 25 g de muestra con 225 mL de diluyente se usará este tipo de dilución para la realización de esta prueba. Homogeneizar la muestra antes de iniciar el proceso.

Se colocan cajas de petri por duplicado y se inocula 1mL del homogeneizado, utilizando para tal propósito una pipeta estéril. Se realizan por lo menos 2 diluciones consecutivas. Posteriormente se vierte de 10 a 15 mL del medio de ARVB (fundido y mantenido a 45°C + 1°C en baño de agua) y apilar en torre.

Se mezcla cuidadosamente el inóculo con el medio, con 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, 6 movimientos en el sentido contrario al de las manecillas del reloj y 6 de atrás hacia delante, sobre una superficie lisa y nivelada permitiendo que la mezcla solidifique dejando las placas de Petri reposando sobre una superficie horizontal fría. También se preparará una caja control con 15 mL de medio para verificar la esterilidad.

Después de que el medio esté completamente solidificado en la caja, se vierte aproximadamente una segunda capa de 4 mL de espesor del medio ARVB, en la superficie del medio inoculado. Se deja solidificar; posteriormente se invierten las placas (boca abajo) y se colocan en la incubadora a 35°C durante 24 h.

Seleccionar las placas que contengan entre 15 -150 colonias. Las colonias típicas son de color rojo oscuro, generalmente se encuentran rodeadas de un halo de precipitación debido a las sales biliares, el cual es de color rojo claro o rosa, la morfología colonial es semejante a lentes biconvexos con un diámetro de 0.5-2.0 mm.

b) *Especificaciones de la cuenta en placas de microorganismos coliformes totales*

Después de la incubación, contar las placas que se encuentren en el intervalo de 15 - 150 colonias características, con ayuda del contador de colonias y el registrador, las placas de al menos una de las tres diluciones deben estar en el intervalo mencionado. Cuando solo una dilución está en el intervalo, siga el ejemplo 1 en la tabla del Apéndice. Calcular la cuenta promedio por gramo o mililitro de producto, multiplicando el número de colonias por el inverso de la dilución correspondiente.

Cuando dos diluciones están en el intervalo apropiado, determinar la cuenta promedio dada de cada dilución antes de promediar la cuenta de las dos diluciones para obtener la cuenta en placa por gramo o mililitro, véase en tabla, ejemplo 2.

Con el fin de unificar los criterios para el reporte de las cuentas en ensayos donde las placas presenten situaciones contempladas en los ejemplos anteriores, se presentan las siguientes guías:

Cuando las placas corridas para la menor dilución muestran cuentas de menos de 15 colonias, contar el número de colonias presentes en dicha dilución, promediar el número de colonias y multiplicar por el factor de dilución para obtener el valor estimado de cuenta en placa. Aclarar en su informe esta situación agregando la leyenda “valor estimado”, véase tabla, ejemplo 3.

Cuando el número de colonias por placa exceda de 150, contar las colonias en aquellas porciones de la placa que sean representativas de la distribución de colonias. Contar, por ejemplo, una cuarta parte o una mitad del área de la caja y multiplicar el valor obtenido por 4 ó 2, respectivamente. Si solamente pueden contarse algunos cuadros, considerar que el fondo de una caja de petri de 100 mm. de diámetro contiene 65 cuadros de la cuadrícula del contador. Entonces contar el cuadro y multiplicar por 65, aclarar en el informe esta situación agregando la leyenda “valor estimado”, véase tabla, ejemplo 4.

Las colonias extendidas pueden presentarse en las siguientes formas:

- Cadenas de colonias no separadas claramente entre sí que parecen causadas por la desintegración de un cúmulo de bacterias.
- Colonias que se desarrollan en película entre el agar y el fondo de la caja.
- Colonias que se desarrollan en película en la orilla de la caja sobre la superficie del agar.
- Colonias de crecimiento extendido y en algunas ocasiones acompañadas de inhibición del crecimiento, que en conjunto excede el 50% de la superficie de la caja o represión del crecimiento que por sí mismo excede el 25% de la superficie de la caja.

Cuando es necesario contar en cajas que contienen colonias extendidas que no están incluidas en (d), contar con cualquiera de los tipos (a), (b), (c), como provenientes de una sola fuente. En el caso de las colonias del tipo (a), si la caja contiene una sola cadena, contar como sola una colonia, si la caja contiene varias cadenas que parecen originarse de fuentes separadas contar cada cadena como colonia individual. No contar cada colonia de la cadena individualmente.

Las colonias del tipo (b) y (c), generalmente se observa como crecimiento diferenciable de otras colonias y se cuentan como tales. Los crecimientos tipo (d), reportarlo como crecimiento extendido. En el caso que una dilución se encuentre dentro del rango y la otra dilución presente colonias de crecimiento extendido, reportar la dilución en la que se puedan contar las colonias, tabla, ejemplo 5.

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, véase tabla, ejemplo 6.

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

Cuando una placa tiene entre 15 y 150 colonias y su duplicado más de 150 colonias, contar ambas placas incluyendo la que está fuera del intervalo para determinar la cuenta en placa, véase tabla, ejemplo 7.

Placas corridas por duplicado, una placa de cada dilución dentro del intervalo de 15 - 150 colonias. - cuando una placa dentro de diferentes diluciones contiene el número de colonias especificadas en el intervalo, contar el número de colonias de las cuatro placas para calcular la cuenta en placa, véase tabla, ejemplo 8.

Placas corridas por duplicado, ambas placas de una dilución dentro del intervalo de 15 - 150 colonias y sólo una de la otra dilución dentro del mismo; se contarán las cuatro cajas incluyendo aquélla con menos de 15 o más de 150 colonias, para calcular la cuenta en placa, véase tabla, ejemplo 9.

Después de contabilizar las colonias en las placas seleccionadas, multiplicar por la inversa de la dilución para obtener el número de UFC por mililitro o gramo de la muestra.

Redondear la cifra obtenida en la cuenta de manera que sólo aparezcan dos dígitos significativos al inicio de esta cifra. Para redondear, llevar 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).

10. Fase Post- analítica

a) *Desecho de residuos*

Se desecharán de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

b) *Lavado de material*

Lavar el material utilizado en la determinación conforme al Procedimiento interno para el Aseguramiento de la Calidad de los Resultados Analíticos.

11. Cálculos

Después de contabilizar las colonias en las placas seleccionadas, efectuar las siguientes fórmulas (Ecuación 1 - 3):

$$X_1 + X_2 = X_3 \quad (1)$$

$$X_3 / 2 = Y \quad (2)$$

$$Y * FD = UFC \quad (3)$$

Donde:

X_1 : Placa 1

X_2 : Placa 2

X_3 : Resultado de la sumatoria de las placas

Y: Media

FD: Factor de Dilución

UFC : Unidades Formadoras de Colonias; expresar los resultados en g o mL.

12. Interpretación de resultados

Dependiendo de las especificaciones microbiológicas que determine la norma para cada alimento serán los rangos de aceptación o rechazo de cada uno de los alimentos en particular.

Para el conteo de bacterias aerobias, revisar el extracto de la NOM-092- SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa, para redondeo de resultados de las UFC. Informar: UFC/g o mL de acuerdo con el tipo de muestra.

Box 5**Tabla 1**

Ejemplos de cálculos de los valores en cuentas de placas

Número	Colonias contadas			UFC/ g o mL
	1: 10	1: 100	1: 1000	
1	>150 ^a	122	12	12 000
		118	11	
2	>150	136	14	14 000
		148	13	
3	11	2	0	110 ^b
	10	0	0	
4	>150	>150	252	240 000 ^b
			234	
5	>150	140	20	14 000
		130	Crecimiento extendido	
6	0	0	0	<10 ^c
7	>150	140	14	15 000*
		168	10	
8	>150	126	12	15 000*
		176	18	
9	>150	125	13	14 000
		145	16	
10	>150	170	21	19 000
		140	16	

a: cuenta por arriba de 150 colonias, b: Debe aclararse "valor estimado" por encontrarse los valores fuera del intervalo de 15 - 150. c: debe informarse de acuerdo a la dilución ensayada y contada, en este caso 1:10. *: símbolo del "Valor estimado".

Fuente: *Elaboración propia, 2024*

13. Validez de la prueba

El método debe cumplirse con estricto apego para que la prueba tenga la validez., e incluir al menos dos bacterias como control, pudiendo ser: *Escherichia coli* LEM 01005, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, que sean tomados de las cepas de referencia por cada lote de muestras procesadas.

14. Medidas de seguridad

- Usar bata de laboratorio, cubre bocas, guantes estériles.
- Verificar que el lugar de trabajo esté limpio.
- Revisar que los reactivos y materiales para el proceso de las muestras estén completos y debidamente identificados.
- Lavarse las manos antes y después del proceso.
- Al término de uso de las cepas de trabajo, se desecharán de a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental- Salud ambiental- Residuos peligrosos biológicos- infecciosos- Clasificación y especificaciones de manejo.
- Descontaminar el material después de su uso de acuerdo a los procedimientos correspondientes.

15. Medidas de control de calidad

- Verificar la funcionalidad del proceso analítico mediante cepas control las cuales deberán demostrar pureza y viabilidad de las mismas.
- En el control de esterilidad anotar observaciones sólo en caso de presentar algún crecimiento en el medio.
- Lectura y registro de temperaturas de incubación con termómetros calibrados y verificados.
- Todos los equipos e instrumentos deberán estar incluidos en un programa de calibración, mantenimiento preventivo y verificación, de acuerdo a las características del equipo.

16. Apéndice

Box 6

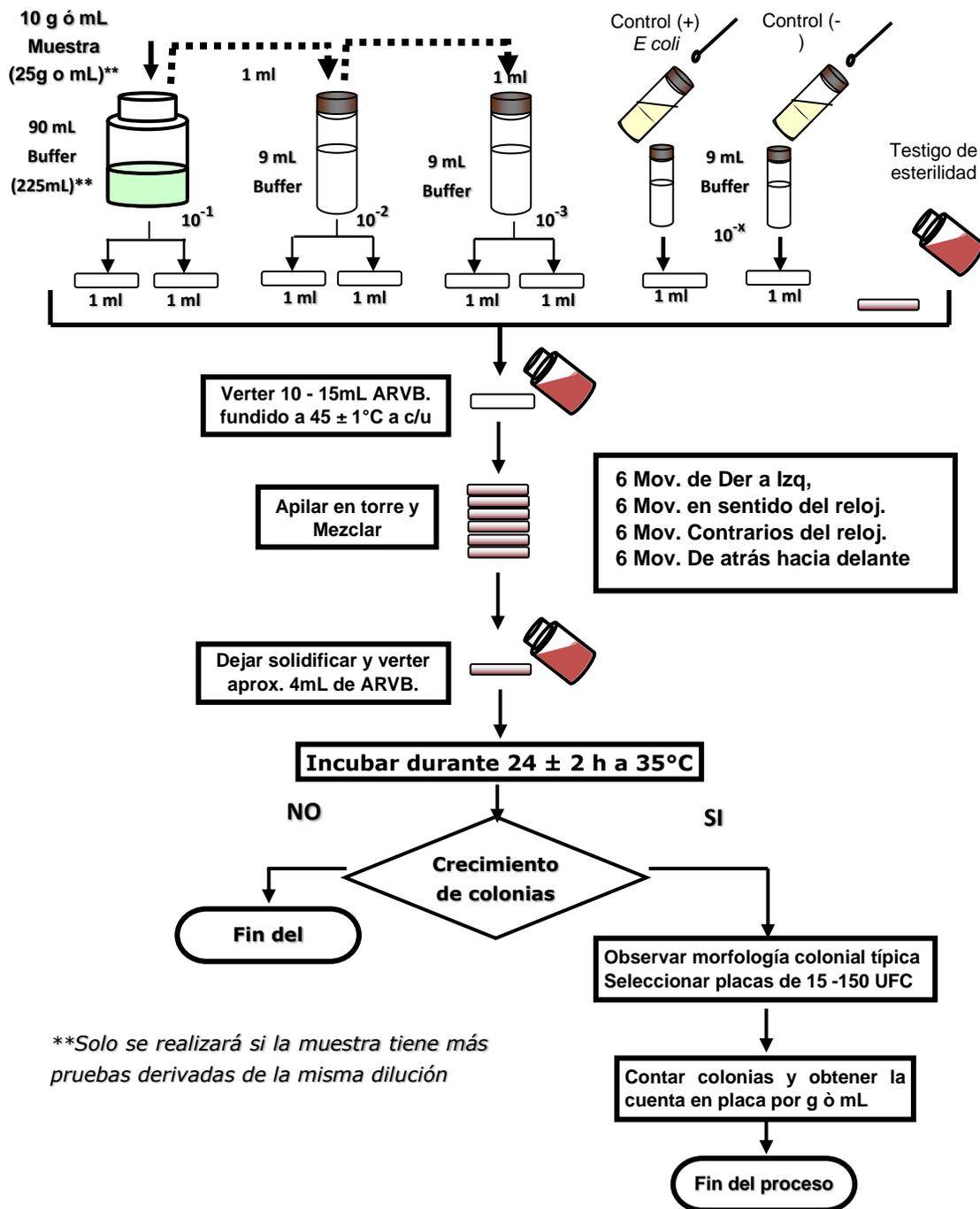


Figura 1

Diagrama para la cuenta de coliformes totales en placa

Fuente: Elaboración propia, 2024

Método de prueba No. 3. Determinación de Mesofílicos aerobios

1. Introducción

El fundamento de la técnica consiste en contar las colonias, que se desarrollan en el medio de elección después de un tiempo y temperatura de incubación presuponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo de la muestra bajo estudio. El método admite numerosas fuentes de variación, algunos de ellas controlables, pero sujetas a la influencia de varios factores. Por otra parte, el recuento de termofílicos, psicofílicos y psicotróficos es importante para predecir la estabilidad del producto bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

2. Objetivo

Describir la técnica para determinar el contenido de Mesofílicos aerobios, por la cuenta de unidades formadoras de colonia (UFC) en un medio sólido, en aguas y alimentos mayormente cocidos.

3. Alcance

Este método se aplica para investigar el contenido de Mesofílicos usado como un indicador sanitario en una amplia variedad de alimentos (mayormente de panificación):

- Pan y Galletas (con relleno y cobertura, combinadas, pan blanco, pan dulce, pan integral y productos de bollería).
- Helados y Sorbetes.
- Aguas para el uso y consumo humano como Purificada y Potable.

4. Referencia normativa

NOM-092-SSA1-1994 Bienes y Servicios Método para la cuenta de Bacterias aerobias en placa.

Se complementa con:

NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

NOM-110-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

5. Términos y definiciones

- Mesófilo: es aquel organismo que tiene una temperatura óptima de crecimiento de entre 15 a 37 °C, la temperatura normal de un cuerpo humano. Su hábitat incluye el suelo, el cuerpo de un animal, etc.
- Muestra: cantidad de material que posee todas las características físicas, fisicoquímicas y microbiológicas del producto a evaluar.
- Psicrófilos: son denominados a los organismos capaces de vivir a temperaturas por debajo de los 5 °C, a veces se los llama criófilos (amantes del hielo).
- Termófilos: son llamados a los organismos que crecen de forma óptima a altas temperaturas
- UFC: término que debe utilizarse para reportar las Unidades Formadoras de Colonias presentes en las placas de agar.

6. Materiales, equipos e instrumentos

- Balanza Analítica Digital
- Baño de agua con cubierta que mantenga una temperatura de 45°C.

- Contador de colonias.
- Enfriador eléctrico de 2-8 °C.
- Homogeneizador peristáltico (Stomacher).
- Incubadora que mantenga una temperatura de 35°C + 1°C.
- Mecheros Bunsen.
- Termómetros de Líquido en vidrio de 20-50°C y de -5-20°C. calibrado y/o verificado.
- Asas desechables de aproximadamente 1 mm de diámetro.
- Batas.
- Bolsas de Stomacher.
- Cajas de Petri estériles de 15 X 100 mm de plástico.
- Cubre bocas.
- Gasas.
- Gradillas para tubos de 16 x 150 mm.
- Guantes desechables de látex.
- Pipetas bacteriológicas graduadas de 5 mL y 10 mL protegidas con tapón de algodón.
- Pipetores.
- Tubos de 16 X 150mm.
- Vaso de precipitado de 500 mL.
- Utensilios como tenedores, cucharas, cuchillos y/o bisturí

Nota: Todo el material que tenga contacto con las muestras se esterilizará en Horno durante 2h a 170-175°C o 1h a 180°C; o en autoclave durante 30 min a una temperatura de 121°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.

7. Reactivos

- Agar Método estándar o Cuenta estándar (ACE).
- Cloruro de 2, 3, 5-Triphenyl-2H-Tetrazolium al 1 %.
- Solución Reguladora de Fosfatos (Buffer).

Nota: Los reactivos y medios de cultivo, se preparan según el fabricante.

8. Fase Pre-analítica

8.1. Condiciones ambientales

La prueba se debe realizar a temperatura ambiental entre 18- 27°C y de 50-65% de humedad.

8.2. Preparación de la muestra

Verificar que el lugar de trabajo esté limpio, todos los reactivos y material para el proceso de las muestras este completo y debidamente identificado.

Las muestras congeladas deben mantenerse en refrigeración (2-5°C) un máximo de 18 h antes de su análisis, sin llegar a la descongelación.

Para muestras congeladas de un alimento originalmente líquido o licuable (ejemplo: savorines, bolis, paletas), fundir por completo en baño de agua de 40- 45°C un tiempo máximo de 15 minutos y homogeneizar agitando vigorosamente la muestra 25 veces en un arco de 30° por 7s

8.3. Preparación del material de trabajo.

Para el caso del ACE estar previamente fundido.

9. Fase analítica

a) *Determinación de Mesofílicos aerobios*

Se pesa una cantidad de 10 g de la muestra por analizar en un recipiente de tamaño adecuado el cual contiene un volumen de 90 mL del diluyente llevado a una temperatura similar a la de la muestra. Se opera en el Stomacher de 1 - 2 min; hasta obtener una suspensión completa. Esta se considera la dilución 10-1. En caso de hacer otras pruebas donde se realice dilución de 25 g de muestra con 225 mL de diluyente se usará este tipo de dilución para la realización de esta prueba.

Se colocan cajas de Petri por duplicado y se inocular 1 mL del homogeneizado, utilizando para tal propósito una pipeta estéril. Se realizan por lo menos 2 diluciones consecutivas. Posteriormente se verte de 10 - 15 mL del medio de ACE fundido y mantenido a 45°C en baño de agua, el cual previamente se le añade 0.5mL del reactivo de Triphenyl por cada 100 mL de agar, esto solo para el caso de alimentos.

Se mezcla cuidadosamente el inóculo con el medio, con 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, 6 movimientos en el sentido contrario al de las manecillas del reloj y 6 de atrás hacia delante, sobre una superficie lisa y nivelada permitiendo que la mezcla solidifique dejando las placas de petri reposando sobre una superficie horizontal fría. También se preparará una caja control con 15 mL de medio para verificar la esterilidad. Posteriormente se invierten las placas (boca abajo) y se colocan en la incubadora a 35°C durante 48 h para el caso de alimentos y 24 h para el caso de las aguas.

Seleccionar las placas que contengan entre 25 - 250 colonias. Contar todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas (excepto la de mohos y levaduras), incluyendo las colonias puntiformes. Hacer uso de la cuenta colonias para resolver los casos en los que no se pueden distinguir las colonias de las pequeñas partículas del alimento, aunque con el reactivo del Triphenyl, las colonias se deberán teñir de rojo

b) *Especificaciones de la cuenta en placas de Mesofílicos aerobios*

Después de la incubación, contar las placas que se encuentren en el intervalo de 25 - 250 colonias, usando el contador de colonias y el registrador, las placas de al menos una de las tres diluciones deben estar en el intervalo mencionado. Cuando solo una dilución está en el intervalo, véase en la tabla 2, ejemplo 1. Calcular la cuenta promedio por gramo o mililitro de producto, multiplicando el número de colonias por el inverso de la dilución correspondiente.

Cuando dos diluciones están en el intervalo apropiado, determinar la cuenta promedio dada de cada dilución antes de promediar la cuenta de las dos diluciones para obtener la cuenta en placa por gramo o mililitro, véase en la tabla 2, ejemplo 2.

Con el fin de unificar los criterios para el reporte de las cuentas en ensayos donde las placas presenten situaciones contempladas en los ejemplos anteriores, se presentan las siguientes guías:

Cuando las placas corridas para la menor dilución muestran cuentas de menos de 25 colonias, contar el número de colonias presentes en dicha dilución, promediar el número de colonias y multiplicar por el factor de dilución para obtener el valor estimado de cuenta en placa. Aclarar en su informe esta situación agregando la leyenda “valor estimado”, véase en la tabla 2, ejemplo 3.

Cuando el número de colonias por placa exceda de 250, contar las colonias en aquellas porciones de la placa que sean representativas de la distribución de colonias. Contar, por ejemplo, una cuarta parte o una mitad del área de la caja y multiplicar el valor obtenido por 4 ó 2, respectivamente. Si solamente pueden contarse algunos cuadros, considerar que el fondo de una caja de petri de 100 mm. de diámetro contiene 65 cuadros de la cuadrícula del contador. Entonces contar el cuadro y multiplicar por 65, aclarar en el informe esta situación agregando la leyenda “valor estimado”, véase el véase en la tabla 2, ejemplo 4.

Las colonias extendidas pueden presentarse en las siguientes formas:

Cadenas de colonias no separadas claramente entre sí que parecen causadas por la desintegración de un cúmulo de bacterias. Colonias que se desarrollan en película entre el agar y el fondo de la caja. Colonias que se desarrollan en película en la orilla de la caja sobre la superficie del agar. Colonias de crecimiento extendido y en algunas ocasiones acompañadas de inhibición del crecimiento, que en conjunto excede el 50 % de la superficie de la caja o represión del crecimiento que por sí mismo excede el 25 % de la superficie de la caja.

Cuando es necesario contar en cajas que contienen colonias extendidas, contar como provenientes de una sola fuente.

En el caso de las colonias del tipo cadena, si la caja contiene una sola cadena, contar como sola una colonia si la caja contiene varias cadenas que aparecen originarse de fuentes separadas contar cada cadena como colonia individual.

No contar cada colonia de la cadena individualmente. Las colonias que se observa como crecimiento diferenciable de otras colonias; se cuentan como tales. Los crecimientos tipo extendido, reportarlo como crecimiento extendido. En el caso que una dilución se encuentre dentro del rango y la otra dilución presente colonias de crecimiento extendido, reportar la dilución en la que se puedan contar las colonias, véase en la tabla 2, ejemplo 5.

Placas sin colonias: reportar la cuenta en placa como menor que una vez el valor de la dilución más baja usada, véase en la tabla 2, ejemplo 6.

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

Placas corridas por duplicado, una con crecimiento dentro del intervalo adecuado y otra con más de 250 colonias: contar ambas placas incluyendo la que está fuera del intervalo para determinar la cuenta en placa, véase en la tabla 2, ejemplo 7.

Placas corridas por duplicado, una placa de cada dilución dentro del intervalo de 25 - 250 colonias: contar el número de colonias de las cuatro placas para calcular la cuenta en placa, véase en la tabla 2, ejemplo 8.

Placas corridas por duplicado, ambas placas de una dilución dentro del intervalo de 25 - 250 colonias y sólo una de la otra dilución dentro del mismo. Contar las cuatro cajas incluyendo aquella con menos de 25 o más de 250 colonias, para calcular la cuenta en placa, véase en la tabla 2, ejemplo 9.

10. Fase Post- analítica

a) Desecho de residuos

Se desecharán de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

b) *Lavado de material*

Lavar el material utilizado en la determinación conforme al Procedimiento interno para el Aseguramiento de la Calidad de los Resultados Analíticos.

11. Cálculos

Después de contabilizar las colonias en las placas seleccionadas, efectuar las siguientes fórmulas (Ecuación 1 - 3):

$$X_1 + X_2 = X_3 \quad (1)$$

$$X_3 / 2 = Y \quad (2)$$

$$Y * FD = UFC \quad (3)$$

Donde:

X_1 : Placa 1

X_2 : Placa 2

X_3 : Resultado de la sumatoria de las placas

Y: Media

FD: Factor de Dilución

UFC : Unidades Formadoras de Colonias; expresar los resultados en g o mL.

12. Interpretación de los resultados

Dependiendo de las especificaciones microbiológicas que determine la norma para cada alimento serán los rangos de aceptación o rechazo de cada uno de los alimentos en particular. Informar: UFC/g o mL de acuerdo con el tipo de muestra.

Box 7

Tabla 2

Ejemplos de cálculos de los valores en cuentas de placas

Número	Colonias contadas			UFC/g o mL
	1: 10	1: 100	1: 1000	
1	>250 ^a	178	16	18 000
		190	17	
2	>250	220	25	25 000
		238	28	
3	18	2	0	160 ^b
	14	0	0	
4	>250	>250	512	500 000 ^b
			495	
5	>250	240	34	24 000
		235	Crecimiento extendido	
6	0	0	0	<10 ^c
7	>250	240	24	25 000*
		268	19	
8	>250	216	23	24 000*
		262	42	
9	>250	215	20	23 000
		235	26	
10	>250	275	32	29 000
		225	26	

a: Cuenta por arriba de 250 colonias. **b:** Debe aclararse "valor estimado" por encontrarse los valores fuera del intervalo de 25 - 250. **c:** Debe informarse de acuerdo a la dilución ensayada y contada, en este caso 1:10. *: Símbolo del "Valor estimado".

13. Validez de la prueba

El método debe cumplirse con estricto apego para que la prueba tenga la validez e incluir al menos dos bacterias como control, pudiendo ser: *Escherichia coli* LEM 01005, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, que sean tomados de las cepas de referencia por cada lote de muestras procesadas

14. Medidas de seguridad

- Usar bata de laboratorio, cubre bocas, guantes estériles.
- Verificar que el lugar de trabajo esté limpio.
- Revisar que los reactivos y materiales para el proceso de las muestras estén completos y debidamente identificados.
- Lavarse las manos antes y después del proceso.
- Al término de uso de las cepas de trabajo, se desecharán de a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental- Salud ambiental- Residuos peligrosos biológicos- infecciosos- Clasificación y especificaciones de manejo.
- Descontaminar el material después de su uso de acuerdo a los procedimientos correspondientes.

15. Medidas de control de calidad

- Verificar la funcionalidad del proceso analítico mediante cepas control las cuales deberán demostrar pureza y viabilidad de las mismas.
- En el control de esterilidad anotar observaciones sólo en caso de presentar algún crecimiento en el medio.
- Lectura y registro de temperaturas de incubación con termómetros calibrados y verificados
- Todos los equipos e instrumentos deberán estar incluidos en un programa de calibración, mantenimiento preventivo y verificación, de acuerdo a las características del equipo.

16. Apéndice

Box 8

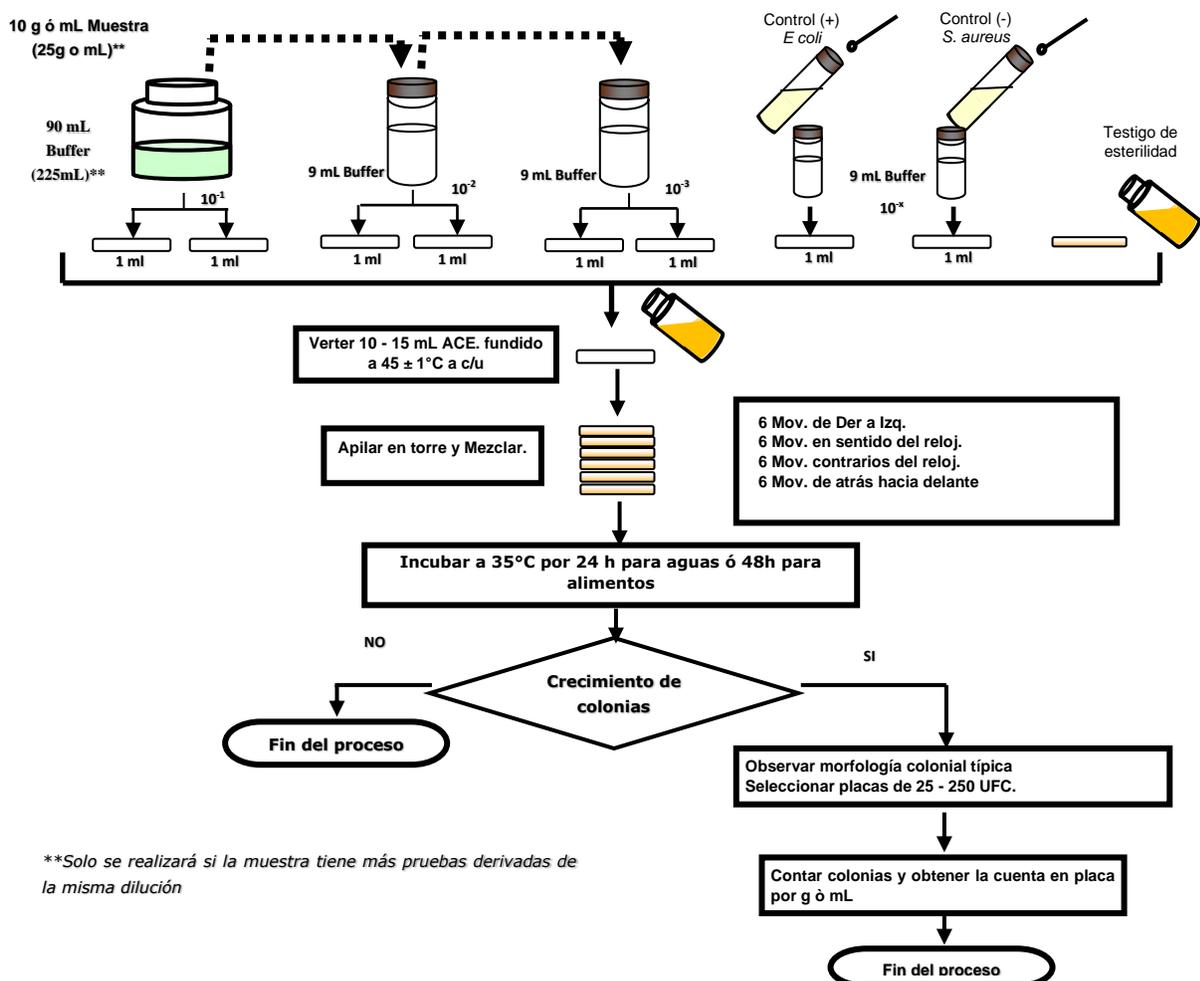


Figura 3

Diagrama para la determinación de Mesofílicos aerobios

Fuente: Elaboración propia, 2024

Método de prueba No. 4. Estimación de la densidad microbiana de Coliformes fecales por la técnica del Número Más Probable (NMP)

1. Introducción

El método del número más probable (NMP) se basa en la dilución de la muestra en tubos múltiples, de tal forma que todos los tubos de la menor dilución sean positivos y todos los tubos de la dilución mayor sean negativos. El resultado positivo se demuestra por la presencia de gas y crecimiento microbiano propiedad de los Coliformes fecales para producir gas a partir de la fermentación de lactosa a $45.5^{\circ}\text{C} + 0.2^{\circ}\text{C}$ (para alimentos), $44.5^{\circ}\text{C} + 0.2^{\circ}\text{C}$ (para agua) dentro de las 48h de incubación.

Para obtener el Número Más Probable (NMP) en los resultados se aplica la teoría de la probabilidad, lo cual tiene como condición una distribución aleatoria de las bacterias que existen en la muestra, las bacterias se encuentran como entidades no agrupadas y los microorganismos presentes en la muestra crecerán en el medio cuando son incubados y se mantengan en las condiciones adecuadas para su desarrollo.

El método del Número Más Probable (NMP) consiste de una prueba presuntiva y confirmativa. La serie de 3 tubos se utiliza para la mayoría de los alimentos, la serie de 5 tubos se emplea para moluscos y para los diversos tipos de aguas, las series de 3, 5 ó 10 tubos se utilizan dependiendo de la contaminación esperada y del grado de exactitud deseado.

Si se espera una cuenta microbiana alta, la muestra debe diluirse mediante diluciones decimales y usando un inóculo en series de tubos. A medida que el número de tubos inoculados para cada dilución aumenta, se reducen los límites de confianza

2. Objetivo

Describir la técnica para estimar la densidad microbiana de Coliformes Fecales por la técnica del Número Más Probable (NMP) de bacterias viables en muestras de aguas y alimentos.

3. Alcance

Este método de prueba es aplicable para aguas de abastecimiento y de banco ostrícola, alimentos preparados, productos cárnicos y productos de la pesca.

4. Referencia normativa

NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Apéndice Normativo H. Método aprobado para la estimación de la densidad de Coliformes Totales, Fecales y *E. coli* por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua.

Se complementa con:

NOM-218-SSA1-2011. Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba.

5. Términos y definiciones

- Agua para uso y consumo humano (potable): agua que no contiene contaminantes objetables, químicos o agentes infecciosos y que no causa efectos nocivos para la salud.
- Agua potable: aquella cuyo uso y consumo no causa efectos nocivos al ser humano, para lo cual debe cumplir con los requisitos que establece el Reglamento y la Norma Oficial Mexicana correspondiente.
- Agua purificada: aquella sometida a un tratamiento físico o químico que se encuentra libre de agentes infecciosos, cuya ingestión no causa efectos nocivos a la salud y que además debe cumplir con los requisitos que se establecen en la Norma Oficial Mexicana correspondiente.

- Coliformes fecales: bacilos cortos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos que fermentan la lactosa con producción de ácido y de gas dentro de las 48h a $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ en agua y a $45.5^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ en alimentos usualmente en caldo *E. coli* (EC).
- Dilución decimal: 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.
- Diluciones decimales adicionales: 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.
- Grupo coliforme: bacilos cortos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, sin formación de spora, que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas dentro de las 48h cuando se incuban a 35°C .
- Hielo purificado: envasado (embolsado), aquel que se obtiene a partir de agua purificada que ha sido sometida a proceso de cristalización, cuya ingestión no cause efectos nocivos para la salud, y para su comercialización se presenta embolsado y que además cumple con los requisitos que se establecen.
- Molusco bivalvo: todas las especies de moluscos lamelibranquios que se alimentan por filtración, que cuentan con dos valvas, ejemplo ostiones, mejillones o almejas.
- Muestra: cantidad de material que posee todas las características físicas, fisicoquímicas y microbiológicas del producto a evaluar.
- Número Más Probable (NMP): término que debe utilizarse para reportar Coliformes.
- Producto a granel: producto que debe pesarse, medirse o contarse en presencia del consumidor al momento de su venta.

6. Materiales, equipos e instrumentos

- Baño de agua con recirculación continua, tapa de dos aguas y termostato que evite variaciones mayores a 0.1°C a una temperatura de $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$.
- Baño de agua con recirculación continua, tapa de dos aguas y termostato que evite variaciones mayores a 0.1°C , a una temperatura de $45.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$.
- Enfriador eléctrico para el guardado de los medios.
- Homogeneizador peristáltico (Stomacher)
- Incubadora de $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.
- Termómetros de inmersión con división mínima de 0.5°C calibrado y/o verificado.
- Termómetros de inmersión de $22-55^{\circ}\text{C}$ con subdivisiones de 0.1°C calibrado y/o verificado.
- Balanza analítica digital con capacidad adecuada y sensibilidad de 0.1 g .
- Motor de licuadora industrial
- Mecheros Bunsen.
- Asa de platino de aproximadamente de 3 mm y 5 mm de diámetro
- Batas
- Bolsas para Stomacher.
- Campanas de fermentación Durham.
- Cubre bocas.
- Gasas.
- Gradillas para tubos de $16 \times 150\text{ mm}$ y $25 \times 200\text{ mm}$
- Guantes desechables de látex.
- Pipetas bacteriológicas graduadas de 1 mL , 5 mL , 10 mL y 25 mL y protegidas con tapón de algodón.
- Pipetores.
- Probetas de 100 mL y 500 mL .
- Recipientes de plástico de boca ancha con tapa de rosca de 500 mL para contener las muestras
- Tubos de $16 \times 150\text{ mm}$ y $25 \times 200\text{ mm}$.

- Vasos de licuadora estériles
- Utensilios: Cucharas, tenedores, cuchillos y hojas de bisturí.

Nota: Todo el material que tenga contacto con las muestras se esterilizará en Horno durante 2h a 170-175°C o 1h a 180°C; o en autoclave durante 30 min a una temperatura de 121°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.

7. Reactivos

- Caldo Lauril Sulfato (CLS) de concentración Sencilla, [2] o [3] (según prueba).
- Caldo EC (*E. coli*)

Nota: Los reactivos y medios de cultivo, se preparan según el fabricante.

8. Fase Pre-analítica

8.1. Condiciones ambientales

La prueba se debe realizar a temperatura ambiental entre 18- 27°C y de 50-65% de humedad.

8.2. Preparación de la muestra

Verificar que el lugar de trabajo esté limpio, todos los reactivos y material para el proceso de las muestras este completo y debidamente identificado

Las muestras congeladas deben mantenerse en refrigeración (2-5°C) un máximo de 18 h antes de su análisis, sin llegar a la descongelación. Para muestras congeladas originalmente líquido (ejemplo: hielo), fundir por completo en baño de agua de 40- 45°C un tiempo máximo de 15 minutos y homogeneizar agitando vigorosamente.

Homogeneizar la muestra antes de iniciar el proceso, agitando vigorosamente la muestra 25 veces en un arco de 30° por 7 s. Para el caso de los garrafones, rotar sobre la superficie de la mesa para poder lograr una homogenización aceptable.

En caso de que la cantidad de muestra disponible sea menor a 25 g y el análisis necesite ser efectuado (denuncia o queja ante la autoridad), utilizar una cantidad de muestra que represente una proporción 1:10.

Para muestras de moluscos bivalvos en general deben tomarse un mínimo de 10 - 12 moluscos bivalvos, a fin de obtener una muestra representativa o dependiendo de la especie se pueden utilizar de 20 a 30 piezas para obtener el peso adecuado hasta obtener un total de 200 g entre licor y carne. Si llegasen a venir en concha, lavarse las manos con agua y jabón antes de comenzar. Enjuagar el exceso de suciedad de las conchas y cepillar con un cepillo estéril bajo el chorro de agua potable poniendo particular atención en las hendiduras de las conchas. Colocar las conchas limpias en toallas de papel absorbente o gasas limpias. Desechar los moluscos que tengan las conchas dañadas o con las valvas abiertas. Se puede usar guantes para evitar dañarse. Una vez secadas, con ayuda de un cuchillo desconchador estéril, insertar las puntas entre las valvas y hacer palanca para cortar el músculo abductor de las conchas y vaciar el molusco en un recipiente estéril.

8.3 Preparación del material de trabajo

a) Procedimiento para agua de uso y consumo humano.

Transferir 10 mL a cada tubo de bioquímica de 25 mm x 200mm de un total de 10 tubos los cuales contengan cada uno 10 mL de CLS de concentración doble [2]. Verificar que las campanas de fermentación Durham no contengan burbuja antes de meter a incubación.

b) Procedimiento para agua de uso recreativo.

Utilizar 5 tubos de CLS por cada porción de 10 mL, 1 mL y 0.1 mL, hacer diluciones decimales cuando se espere una densidad microbiana alta y considerarlo para el cálculo. Se utilizan 5 tubos de CLS de concentración doble [2] para agregar 10mL, 5 tubos de CLS de concentración sencilla para 1mL y 5 tubos de CLS de concentración sencilla para 0,1mL de muestra respectivamente. Verificar que las campanas de fermentación Durham no contengan burbuja antes de meter a incubación.

c) Procedimiento de agua de mar para el cultivo de moluscos bivalvos.

Utilizar 5 tubos de CLS por cada porción de 10 mL, 1 mL y 0.1 mL, hacer diluciones decimales cuando se espere una densidad microbiana alta y considerarlo para el cálculo. Se utilizan 5 tubos de CLS de concentración doble [2] para agregar 10mL, 5 tubos de CLS de concentración sencilla para 1 mL y 5 tubos de CLS de concentración sencilla para 0,1mL de muestra respectivamente. Verificar que las campanas de fermentación Durham no contengan burbuja antes de meter a incubación.

d) Determinación de Coliformes fecales en alimentos.

Pesar 25 g ó mL de muestra en 225 mL de regulador de fosfatos (dilución 1:10) y homogeneizar por 2 minutos en vaso de licuadora u homogeneizador peristáltico (Stomacher), el volumen total en el vaso debe cubrir totalmente las aspas. Preparar diluciones decimales con regulador de fosfatos. La cantidad de diluciones dependerá de la densidad de Coliformes esperada. Agitar las diluciones veinticinco veces en un arco de 30 cm por 7 s. Transferir volúmenes de 1 mL a 3 tubos con 10 mL de CLS de concentración sencilla en cada tubo por cada dilución por lo menos tres diluciones consecutivas (el volumen que se transfiera nunca debe ser menor del 10% de la capacidad total de la pipeta). Mantener la pipeta en ángulo de tal manera que descansa sobre el borde del tubo. El tiempo entre la homogeneización de la muestra y la inoculación de los tubos no debe exceder de 15 - 20 min.

e) Determinación de Coliformes fecales en moluscos bivalvos y cefalópodo.

Pesar el total de la muestra, máximo 200 g (carne y licor) y adicionar igual cantidad de solución reguladora de fosfatos o diluyente de peptona al 0.5% para obtener una dilución 1:2. Homogeneizar durante 2 minutos. Pesar 20 g de la muestra anterior en 80 mL de solución reguladora de fosfatos o diluyente de peptona al 0.5%, agitar la dilución 25 veces en 7 segundos, haciendo un arco de 30cm de arriba hacia abajo; esto constituye la dilución 1:10. Hacer diluciones seriadas transfiriendo 10 mL de cada dilución en 90 mL del diluyente de elección (diluciones 1:100 y 1:1000) y agitar como se indicó anteriormente.

- Inocular 5 tubos con 10 mL de CLS concentración sencilla con 1 mL de la dilución 1:10, que equivale a 0,1 g de molusco.
- Inocular 5 tubos con 10 mL de CLS concentración sencilla con 1 mL de la dilución 1:100, que equivale a 0,01 g de molusco.
- Inocular 5 tubos con 10 mL de CLS concentración sencilla con 1 mL de la dilución 1:1000, que equivale a 0,001 g de molusco.

9. Fase analítica

a) *Prueba presuntiva*

Iniciar según se indica en cada procedimiento para las diferentes muestras:

Así mismo correr 3 tubos de CLS simultáneamente con las muestras, uno inoculado con *Enterobacter aerogenes* como control positivo, otro con *Staphylococcus aureus* como control negativo y uno sin inocular como control de esterilidad. Incubar los tubos en la estufa a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Examinar a las 24 h y observar si hay formación de gas. Si la formación de gas no se observa en este tiempo, incubar por 24 h más y anotar resultados.

b) *Prueba confirmativa*

Partiendo de la lectura preliminar de la prueba anterior, de cada tubo que muestre formación de gas, se tomará una asada y se sembrará en un número igual de tubos bioquímica 16 x 150 mm los cuales contengan 10 mL de caldo EC para la confirmación de bacterias Coliformes fecales los cuales contienen en su interior campanas de fermentación Durham.

Verificar que estos últimos no contengan burbuja antes de meter a incubación. Así mismo correr 3 tubos de Caldo EC simultáneamente con las muestras, uno inoculado con *Escherichia coli* como control positivo, otro con *Enterobacter aerogenes* como control negativo y uno sin inocular como control de esterilidad.

Para aguas de uso y consumo humano; uso recreativo; agua de mar de cultivo de moluscos y; para moluscos bivalvos y cefalópodos, Incubar a $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ en baño de agua con recirculación continua. Para alimentos incubar a $45,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ en baño de agua con recirculación continua. Dejar durante 24 h, observar si hay formación de gas, registrar la lectura, en caso de no haber formación de gas, incubar 24 h más y anotar resultados.

10. Fase Post-Analítica

a) Desecho de residuos

Se desecharán de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

b) Lavado de material

Lavar el material utilizado en la determinación conforme al Procedimiento interno para el Aseguramiento de la Calidad de los Resultados Analíticos.

11. Cálculos

Calcular la densidad microbiana en Número Más Probable de Coliformes fecales consultando las tablas correspondientes de acuerdo con la serie de tubos empleados. Las tablas de resultados se encuentran inmersas en la NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.

12. Interpretación de resultados

Expresar en NMP/g ó mL para alimentos, NMP/100 g para moluscos bivalvos y NMP/100 mL para agua. Cuando se obtienen resultados negativos (ausencia de gas en los tubos), informar el límite de detección que corresponde a menos de una vez el valor más bajo del NMP de la tabla utilizada, excepto en el caso de las aguas para uso y consumo humano que por acuerdo internacional se informa como “No Detectable” ó “ND”; así mismo cuando la combinación de tubos de aguas de banco ostrícola sea 0-0-0 se debe reportar <2.0 NMP/100mL.

13. Validez de la prueba

El método debe cumplirse con estricto apego para que la prueba tenga la validez., e incluir al menos dos bacterias como control, pudiendo ser: *Escherichia coli* LEM 01005, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, que sean tomados de las cepas de referencia por cada lote de muestras procesadas.

14. Medidas de seguridad

- Usar bata de laboratorio, cubre bocas, guantes estériles.
- Verificar que el lugar de trabajo esté limpio.
- Revisar que los reactivos y materiales para el proceso de las muestras estén completos y debidamente identificados.
- Lavarse las manos antes y después del proceso.
- Al término de uso de las cepas de trabajo, se desecharán de a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental- Salud ambiental- Residuos peligrosos biológicos- infecciosos- Clasificación y especificaciones de manejo.
- Descontaminar el material después de su uso de acuerdo a los procedimientos correspondientes.

15. Medidas de control de calidad

- Verificar la funcionalidad del proceso analítico mediante cepas control las cuales deberán demostrar pureza y viabilidad de las mismas.
- En el control de esterilidad anotar observaciones sólo en caso de presentar algún crecimiento en el medio.
- Lectura y registro de temperaturas de incubación con termómetros calibrados y verificados.
- Todos los equipos e instrumentos deberán estar incluidos en un programa de calibración, mantenimiento preventivo y verificación, de acuerdo a las características del equipo.

16. Apéndice

Box 9

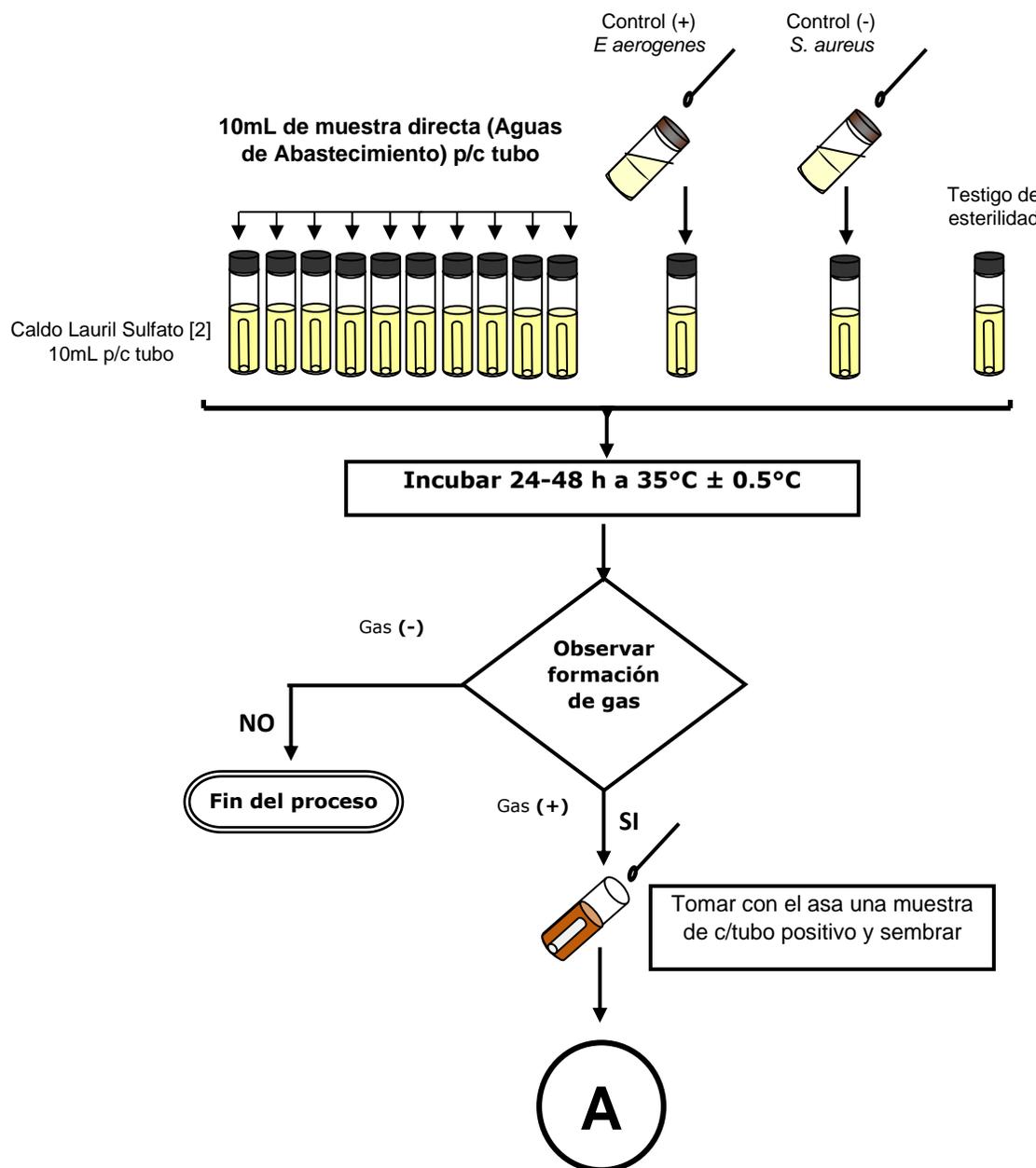


Figura 1

Diagrama para la determinación de *C. fecales* para agua de uso y consumo

Fuente: *Elaboración propia, 2024*

Box 10

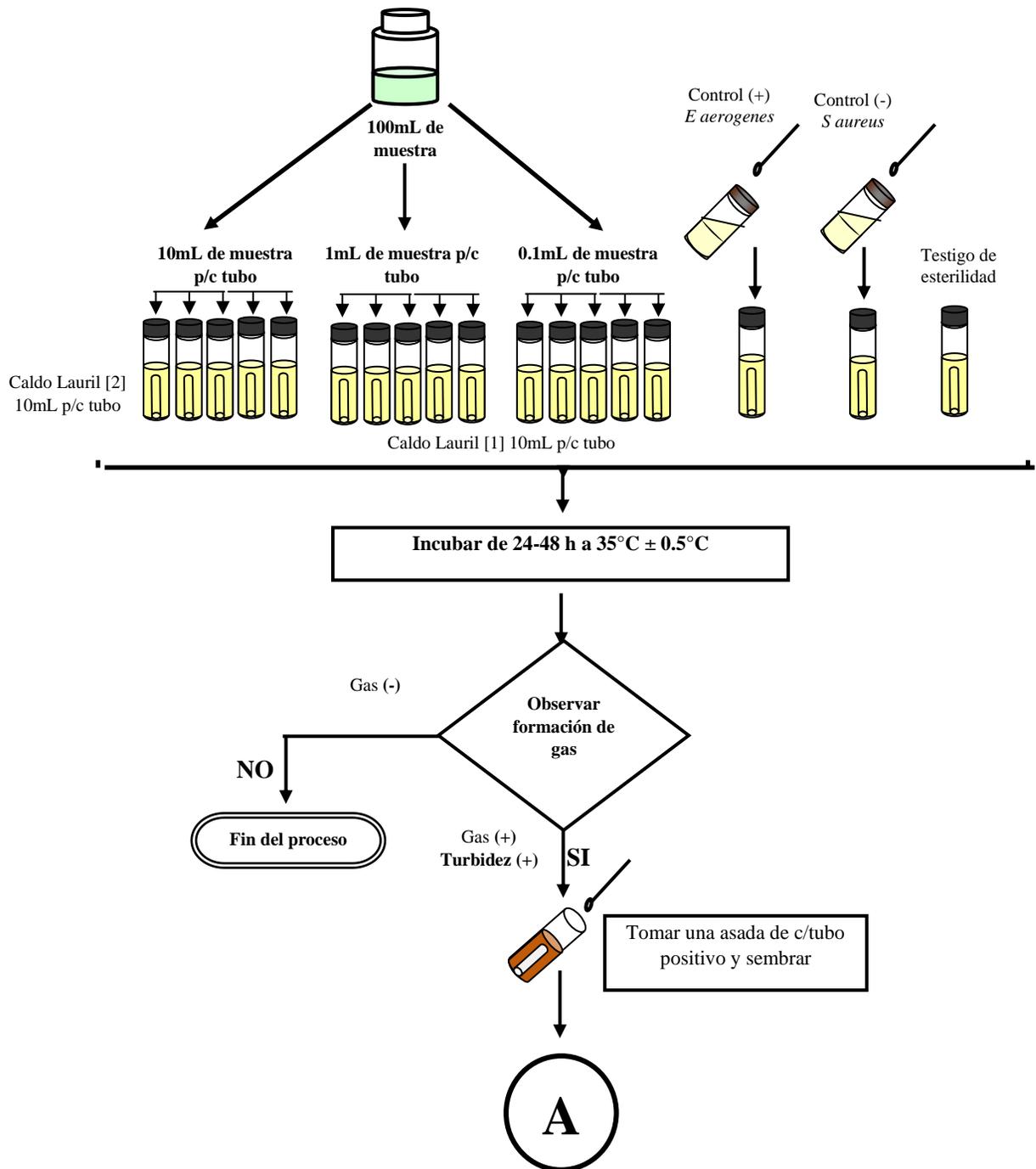


Figura 2

Diagrama para la determinación de *C. fecales* para agua de recreativo y para agua de mar para el cultivo de moluscos bivalvos

Fuente: *Elaboración propia, 2024*

Box 11

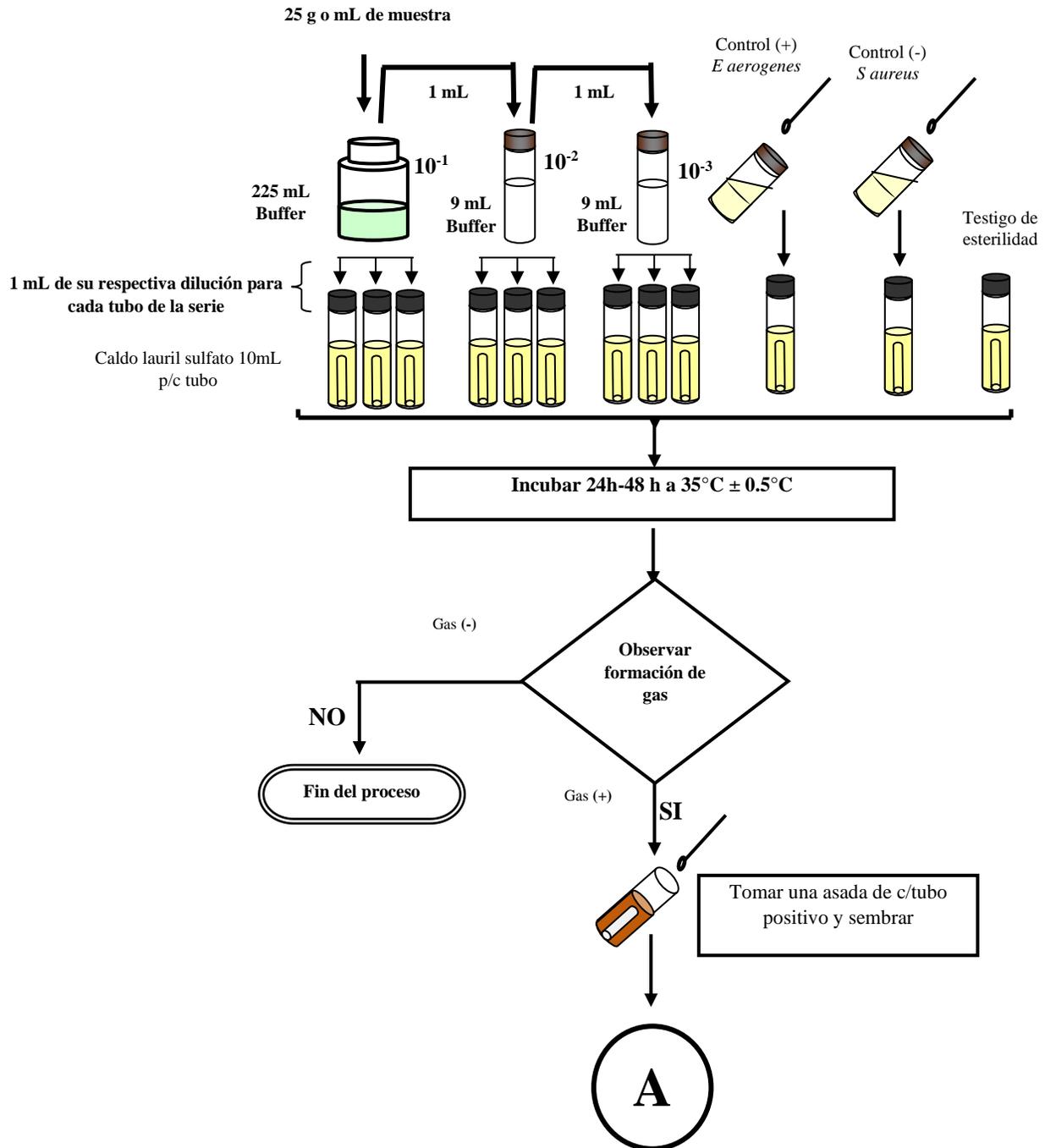


Figura 3
Diagrama para la determinación de *C. fecales* para alimentos

Fuente: *Elaboración propia, 2024*

Box 12

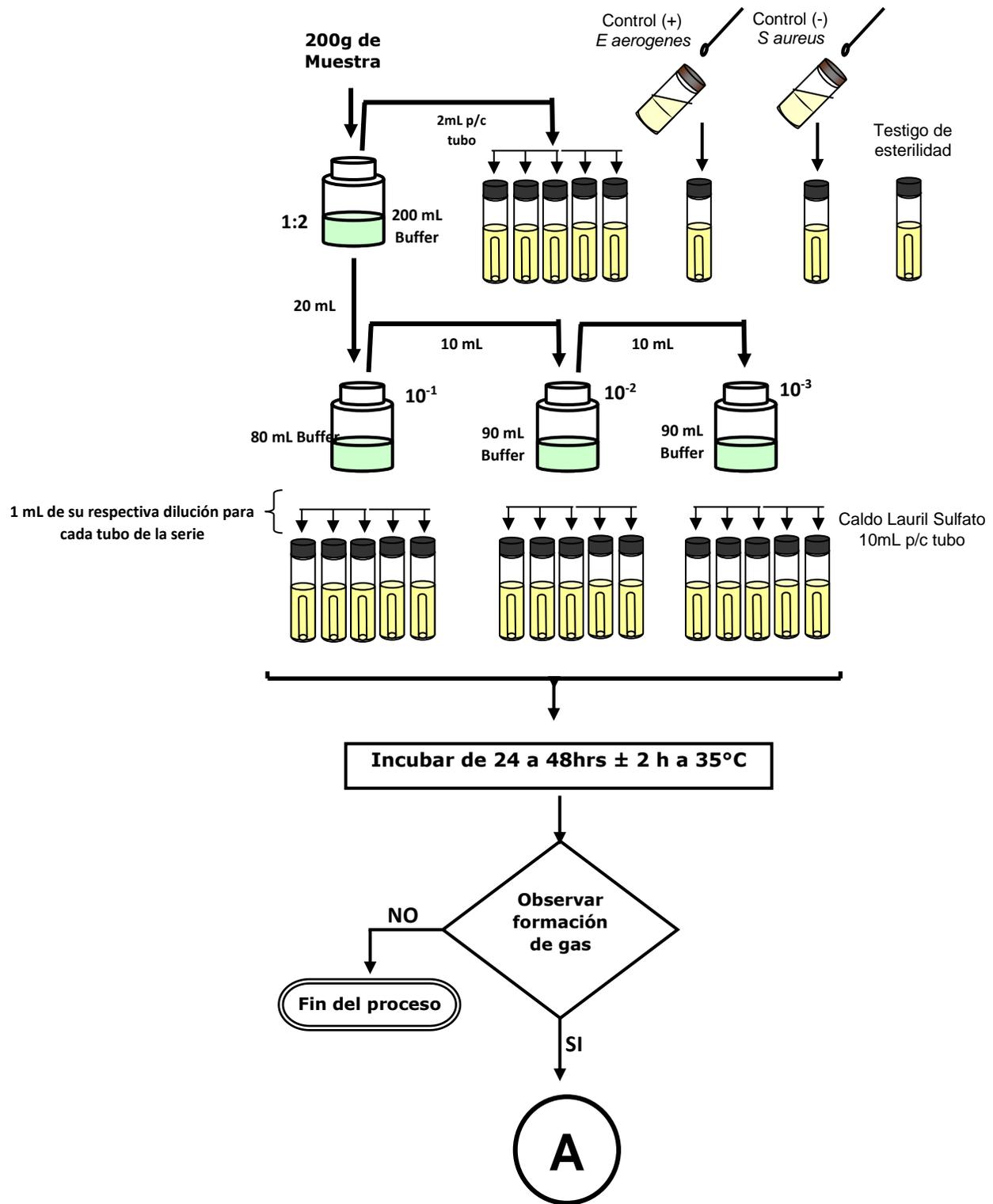


Figura 4
Diagrama para la determinación de *C. fecales* para moluscos bivalvos

Fuente: *Elaboración propia, 2024*

Box 13

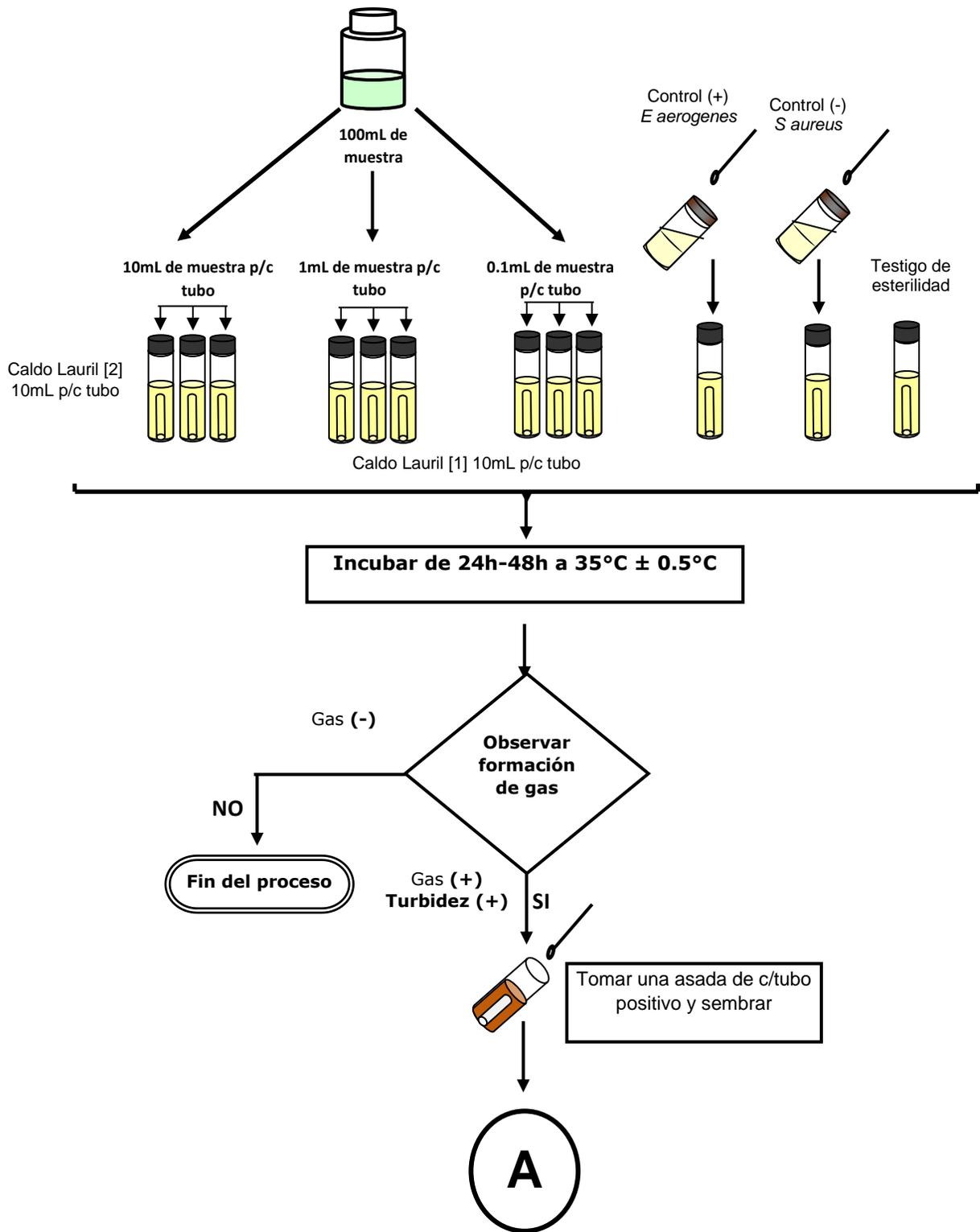


Figura 5

Diagrama para la determinación de *C. fecales* en bebidas saborizadas no alcohólicasFuente: *Elaboración propia, 2024*

Box 14

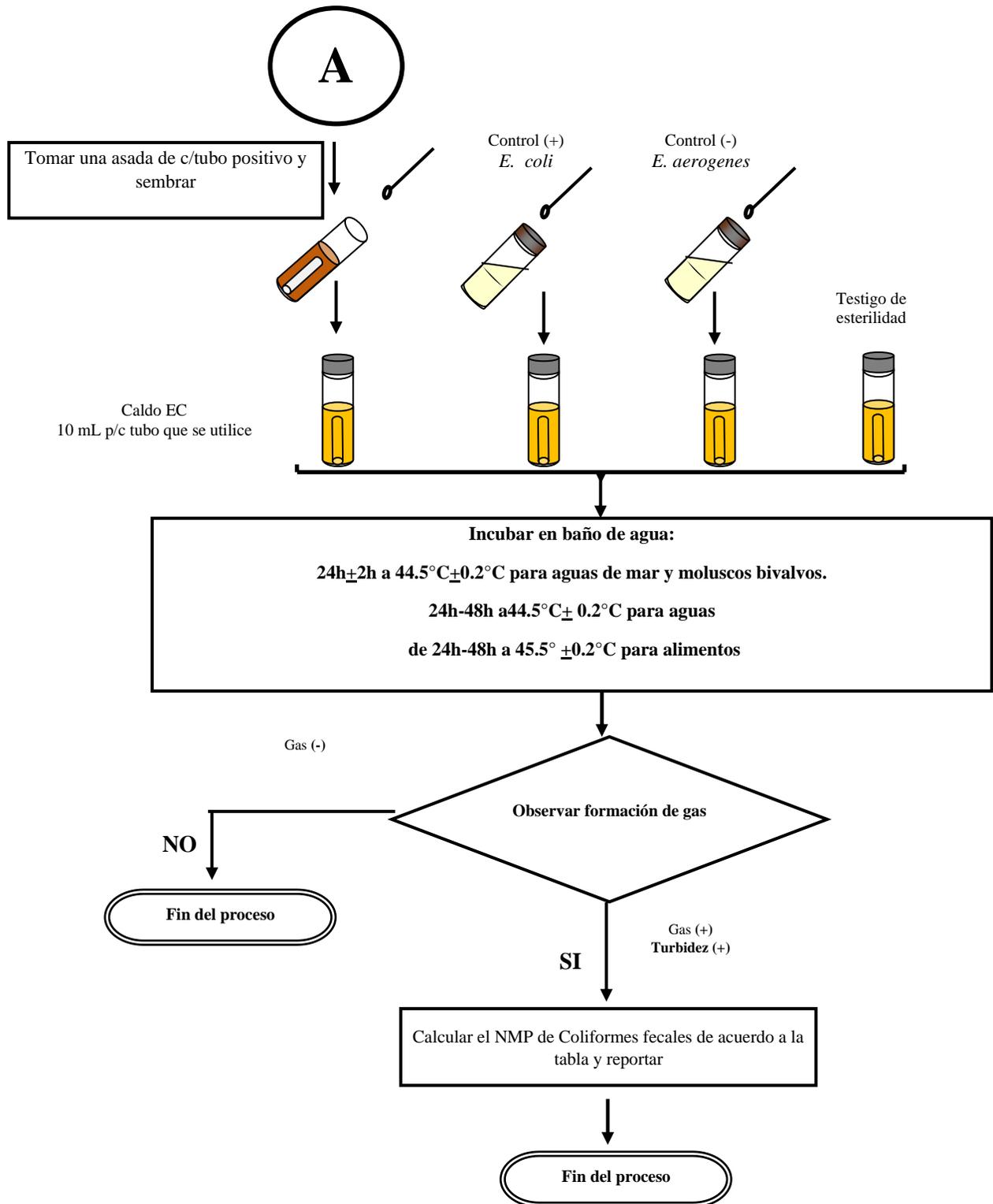


Figura 6

Diagrama confirmativo para la determinación de Coliformes fecales

Método de prueba No. 5. Cuenta de mohos y levaduras

1. Introducción

El método para la cuenta de mohos y levaduras se basa en inocular una cantidad conocida de muestra de prueba en un medio selectivo específico, acidificado a un pH 3.5 e incubado a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, dando como resultado el crecimiento de colonias características para este tipo de microorganismos.

2. Objetivo

Describir la técnica para determinar el número de mohos y levaduras viables presentes en productos destinados al consumo humano por medio de la cuenta en placa a $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

3. Alcance

Este método se aplica para cuantificar los mohos y levaduras en los alimentos, puesto que, al establecer la cuenta de estos microorganismos, permite su utilización como un indicador de prácticas sanitarias inadecuadas durante la producción y el almacenamiento de los productos, así como el uso de materia prima inadecuada.

4. Referencia normativa

NOM-111-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

Se complementa con:

NOM-110-SSA1-1994 Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

NOM-092-SSA1-1994 Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

5. Términos y definiciones

- Colonias: agrupamiento de células en forma de masas visibles, sobre el agar de cultivo.
- Levaduras: son 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.
- Mohos: grupo de hongos microscópicos; organismos pertenecientes al reino Fungi, que se caracterizan por tener un cuerpo formado por 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 flageladas o no, las paredes celulares pueden ser de queratina o celulosa. Crecen formando colonias en un medio selectivo a 25°C .
- Unidades Formadoras de Colonias (UFC): término que debe utilizarse para reportar la cuenta de colonias en placa, las cuales pueden surgir de una célula o de un cúmulo de células.

6. Materiales, equipos e instrumentos

- Balanza Analítica Digital
- Baño de agua con cubierta que mantenga una temperatura de 45°C .
- Contador de colonias
- Enfriador eléctrico de $2- 8^\circ\text{C}$.
- Incubadora que mantenga una temperatura de $25^\circ\text{C} + 1^\circ\text{C}$.
- Mecheros Bunsen
- Licuadora industrial
- Termómetros de Líquido en vidrio de $20-50^\circ\text{C}$ y de $-5-20^\circ\text{C}$. Calibrado y/o verificado.
- Batas
- Cajas de Petri estériles de 15 X 100 mm de plástico o de vidrio.
- Cubre bocas.
- Gasas.

- Gradillas para tubos de 16 x 150 mm
- Guantes desechables de látex.
- Pipetas bacteriológicas graduadas de 5 mL y 10 mL protegidas con tapón de algodón.
- Pipetores.
- Tubos de 16 X 150 mm.
- Vaso de precipitado de 500 mL.
- Utensilios como tenedores, cucharas, cuchillos y/o bisturí

Nota: Todo el material que tenga contacto con las muestras se esterilizará en Horno durante 2 h a 170-175°C o 1 h a 180°C; o en autoclave durante 30 min a una temperatura de 121°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.

7. Reactivos

- Agar Papa Dextrosa (PDA).
- Solución reguladora de fosfatos (Solución concentrada).
- Solución estéril de ácido tartárico al 10%.

Nota: Los reactivos y medios de cultivo, se preparan según el fabricante.

8. Fase Pre-analítica

8.1. Condiciones ambientales

La prueba se debe realizar a temperatura ambiental entre 18- 27°C y de 50-65% de humedad.

8.2. Preparación de la muestra

Verificar que el lugar de trabajo esté limpio, todos los reactivos y material para el proceso de las muestras este completo y debidamente identificado

La preparación se efectuará de acuerdo a la naturaleza de la muestra:

- Líquidas no viscosas (agua, leche, etc.), fácilmente homogeneizable por medios mecánicos (agitación).
- Congeladas, fundir por completo en baño de agua de 40 - 45°C un tiempo máximo de 15 minutos y homogeneizar agitando vigorosamente; homogeneizar la muestra antes de iniciar el proceso, agitando vigorosamente la muestra 25 veces en un arco de 30° por 7s. Las muestras deben mantenerse en refrigeración (2-5°C) un máximo de 18 h antes de su análisis, sin llegar a la descongelación.
- Sólidas y semisólidas congeladas, deben descongelarse en refrigeración de 4 - 8°C durante 18 h y no más de 24 h antes de proceder a su análisis.

8.3. Preparación del material de trabajo.

Para el caso del PDA estar previamente fundido.

9. Fase analítica

Cuenta de mohos y levaduras: Se pesa una cantidad de 10 g de la muestra por analizar en un recipiente de tamaño adecuado el cual contiene un volumen de 90 mL del diluyente llevado a una temperatura similar a la de la muestra. Se opera en la licuadora de 1 a 2 min; hasta obtener una suspensión completa. Esta se considera la dilución 10-1. Se colocan cajas de Petri por duplicado y se inocula 1 mL del homogeneizado, utilizando para tal propósito una pipeta estéril. Se realizan por lo menos 2 diluciones consecutivas. Posteriormente se verte de 10 a 15 mL del medio de PDA fundido y mantenido a 45°C en baño de agua, el cual previamente se le añade 1.4 mL de solución estéril de ácido tartárico al 10% por cada 100 mL de medio fundido obteniendo un pH de 3,5

Se mezcla cuidadosamente el inóculo con el medio, con 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, 6 movimientos en el sentido contrario al de las manecillas del reloj y 6 de atrás hacia delante, sobre una superficie lisa y nivelada permitiendo que la mezcla solidifique dejando las placas de Petri reposando sobre una superficie horizontal fría. También se preparará una caja control con 15 mL de medio para verificar la esterilidad. Posteriormente se invierten las placas (boca abajo) y se colocan en la incubadora a 25°C durante 5 días. Seleccionar las placas que contengan entre 10 -150 colonias.

Contar todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas, incluyendo las colonias puntiformes. Hacer uso de la cuenta colonias para resolver los casos en los que no se pueden distinguir las colonias de las pequeñas partículas del alimento.

10. Fase Post- analítica

a) Desecho de residuos

Se desecharán de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

b) Lavado de material

Lavar el material utilizado en la determinación conforme al Procedimiento interno para el Aseguramiento de la Calidad de los Resultados Analíticos.

11. Cálculos

Después de contabilizar las colonias en las placas seleccionadas, efectuar las siguientes fórmulas (Ecuación 1 - 3):

$$X_1 + X_2 = X_3 \quad (1)$$

$$X_3 / 2 = Y \quad (2)$$

$$Y * FD = UFC \quad (3)$$

Donde:

X_1 : Placa 1

X_2 : Placa 2

X_3 : Resultado de la sumatoria de las placas

Y: Media

FD: Factor de Dilución

UFC : Unidades Formadoras de Colonias; expresar los resultados en g o mL.

12. Interpretación de resultados

- Dependiendo de las especificaciones microbiológicas que determine la norma para cada alimento serán los rangos de aceptación o rechazo de cada uno de los alimentos en particular.
- Informar: UFC/g o mL de acuerdo al tipo de muestra.
- Unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro (UFC/g o ml) de mohos en agar papa - dextrosa acidificado, incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 días.
- Unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro (UFC/g o ml) de levaduras en agar papa-dextrosa acidificado, incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 día.

13. Validez de la prueba

El método debe cumplirse con estricto apego para que la prueba tenga la validez., e incluir al menos dos mohos o levaduras como control a la referencia normativa.

14. Medidas de seguridad

- Usar bata de laboratorio, cubre bocas, guantes estériles.
- Verificar que el lugar de trabajo esté limpio.
- Revisar que los reactivos y materiales para el proceso de las muestras estén completos y debidamente identificados.
- Lavarse las manos antes y después del proceso.
- Al término de uso de las cepas de trabajo, se desecharán de a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental- Salud ambiental- Residuos peligrosos biológicos- infecciosos- Clasificación y especificaciones de manejo.
- Descontaminar el material después de su uso de acuerdo a los procedimientos correspondientes.

15. Medidas de control de calidad

- Verificar la funcionalidad del proceso analítico mediante cepas control las cuales deberán demostrar pureza y viabilidad de las mismas.
- En el control de esterilidad anotar observaciones sólo en caso de presentar algún crecimiento en el medio.
- Lectura y registro de temperaturas de incubación con termómetros calibrados y verificados.
- Todos los equipos e instrumentos deberán estar incluidos en un programa de calibración, mantenimiento preventivo y verificación, de acuerdo a las características del equipo.

16. Apéndice

Box 15

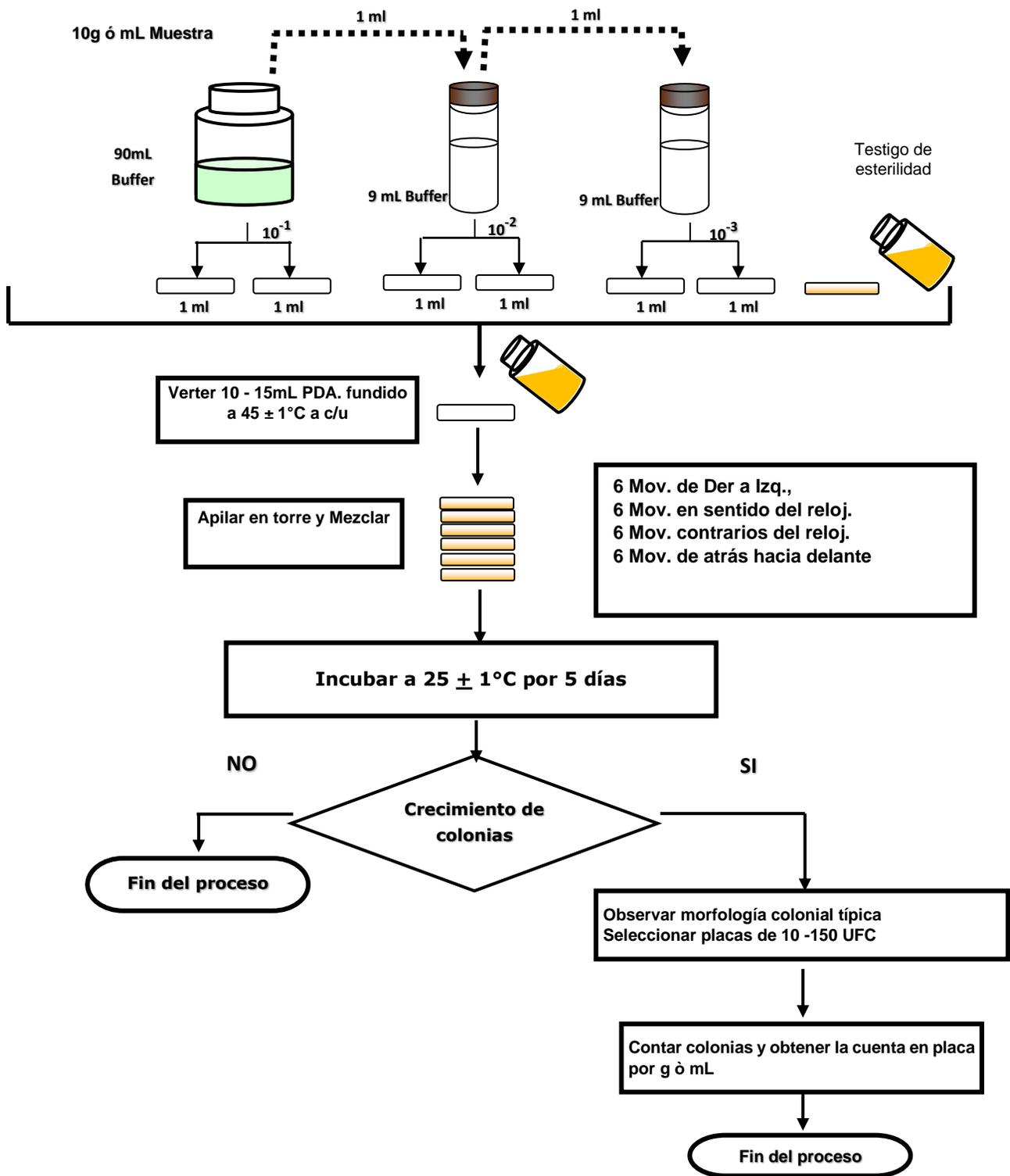


Figura 5

Determinación de hongos y levaduras

Fuente: *Elaboración propia, 2024*

Método de prueba No. 6. Determinación de Enterococos

1. Introducción

El método Enterolert se basa en la tecnología de sustrato definido (DST). La reacción se lleva a cabo cuando los Enterococos utilizan su enzima B-glucosidasa para metabolizar el indicador de nutriente de Enterolert, 4-metil-umbeliferil B-D-glucosida, ocasionando que la muestra presente fluorescencia, cuando se expone a la luz ultravioleta a 365nm.

2. Objetivo

Establecer la metodología para determinar la presencia de *Enterococos* por la técnica del Número Más Probable (NMP) mediante el sustrato fluorogénico con el kit Enterolert.

3. Alcance

Este método de prueba es aplicable para las aguas dulces y salobres de contacto humano, como playas recreativas, balnearios, manantiales, fuentes de abastecimiento, etc.

4. Referencia normativa

NOM-210-SSA1-2014. Productos y Servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.

Se complementa con:

NMX-AA-120-SCFI-2006 Que establece los Requisitos y Especificaciones de sustentabilidad de Calidad de Playas.

NOM-110-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

Información disponible en Internet sobre la calidad de agua proporcionada por las Secretarías de Marina, Medio Ambiente y Recursos Naturales, Salud y Turismo de la República Mexicana.

Información y Metodología proporcionada por Laboratorios IDEXX. Kit Enterolert.

5. Términos y definiciones

- Enterococos fecales: Subgrupo de los estreptococos fecales y son diferenciados de otros estreptococos por su habilidad para crecer en 6.5 % de cloruro de sodio, pH de 9.6 y entre 10°C y 45 °C, además de estar relacionado directamente con enfermedades como gastroenteritis, enfermedades respiratorias, conjuntivitis y dermatitis, entre otras. Es Indicador Bacteriológico
- Enterococos intestinales: a los miembros de la familia Enterococcaceae que incluye a *E. faecalis*, *E. faecium*, *Enterococcus durans* y *Enterococcus hirae*. Son cocos Gram positivos que al crecer se agrupan en cadenas cortas o en pares de cocos Gram positivos, anaerobios facultativos, inmóviles, catalasa negativos.
- Playas Recreativas: Aquellas donde se realizan actividades de esparcimiento.
- Muestra: al número de unidades tomadas de un lote, que han sido seleccionadas en forma aleatoria y cuyas características son lo más similar posible a las del lote que procede.
- Dilución Primaria: 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.
- Fluorescencia: fenómeno por el cual algunas sustancias tienen la capacidad de absorber luz a una determinada longitud de onda, por lo general en el rango ultravioleta, y luego emiten luz en una longitud más larga.

- NMP: Número Más Probable.

6. Materiales, equipos e instrumentos

- Asas de 1µL
- Balanza con capacidad adecuada y sensibilidad de 0.1g.
- Charolas estériles desechables Quanti-Tray
- Cubre bocas.
- Enfriador eléctrico de 2°C a 8 °C.
- Gabinete de Luz Ultravioleta ó Lámpara de luz ultravioleta con longitud de onda larga de 365nm.
- Gasas.
- Googles
- Guantes desechables de látex.
- Incubadora que mantenga una temperatura de 35°C + 0.5°C.
- Mechero Bunsen
- Pipetas bacteriológicas de 10mL protegidas con tapón de algodón.
- Pipetores.
- Sellador de charolas Quanti-Tray
- Termómetros Calibrados: Líquido en vidrio de 20-50°C y de -5-20°C.

Nota: Todo el material que tenga contacto con las muestras se esterilizará en Horno durante 2 h a 170-175°C o 1 h a 180°C; o en autoclave durante 30 min a una temperatura de 121°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.

7. Reactivos

- Agua Desionizada o Destilada estéril
- Kit de prueba Enterolert™

Nota: Los reactivos y medios de cultivo, se preparan según el fabricante.

8. Fase Pre-analítica

8.1. Condiciones ambientales

La prueba se debe realizar a temperatura ambiental entre 18- 27°C y de 50-65% de humedad.

8.2. Preparación de la muestra

Verificar que el lugar de trabajo esté limpio. Todos los reactivos y materiales para el proceso de las muestras estén completos y debidamente identificados.

Las muestras congeladas deben mantenerse en refrigeración (2°C-5°C) un máximo de 18 horas antes de su análisis, sin llegar a la descongelación.

Homogeneizar la muestra antes de iniciar el proceso, agitando vigorosamente la muestra 25 veces en un arco de 30° por 7s a excepción de muestras de alimentos.

Realizar el pesado de las muestras con el diluyente para tener una mayor exactitud en la dilución, el cual debe encontrarse a una temperatura similar a ésta

8.3. Preparación del material de trabajo.

Para el caso del reactivo y charolas Quanty-Tray consultar las instrucciones del Kit de prueba Enterolert™.

9. Fase analítica

Procedimiento de enumeración Quanti-Tray:

Las muestras deben alcanzar una Temperatura Ambiente (18°C a 27°C). Para Agua Dulce usar 100 mL de muestra. Para Aguas salobres, preparar una dilución 1:10. Utilizar agua estéril Desionizada o destilada, libre de oxidantes y de presencia de Bacillus que pueden interferir con la prueba. Añadir 10mL de muestra a 90mL de agua estéril, mezclar y agregar el contenido de un paquete de reactivo, cuidando no tocar la abertura del paquete, para evitar contaminación. Tapar y agitar el recipiente hasta disolución del reactivo. Verter la mezcla de muestra en una charola ya identificada de Quanti-Tray. Sellar la charola en un sellador de Quanti-Tray para distribuir la muestra en los 49 pocillos grandes y 48 pocillos pequeños. Colocar la bandeja sellada con los pocillos hacia abajo, en una incubadora a 41°C ± 0.5°C durante 24h.

Después del tiempo de incubación establecido, se procede a leer las charolas con muestra, buscando fluorescencia. La lectura se hará en el gabinete de luz ultravioleta a 365nm, ó usando una lámpara de luz ultravioleta, en un entorno oscuro; asegurarse que el haz de luz se encuentre alejada de los ojos y dirigida hacia la muestra. Cuando el sustrato es hidrolizado por la enzima de la bacteria produce en la celda o pocillo un color azul, interpretándose este como Positivo y la muestra es Negativa si no se observa ningún cambio de color. Contar el número de pocillos (grandes y chicos) fluorescentes (Positivos) de las charolas y referirse a la tabla NMP (Número más Probable) proporcionado por el fabricante para determinar el NMP/100mL.

10. Fase Post- analítica

c) Desecho de residuos

Se desecharán de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

d) Lavado de material

Lavar el material utilizado en la determinación conforme al Procedimiento interno para el Aseguramiento de la Calidad de los Resultados Analíticos.

11. Cálculos

Interpolan los resultados positivos en las Tablas de Numero más Probable. Multiplicar el valor NMP por el factor de dilución para obtener el resultado cuantitativo apropiado NMP/100mL. Ejemplo:

-	N° de pozos pequeños positivos:	4
-	N° de pozos grandes positivos:	20
-	Valor interpretado en la Tabla N°1:	30.1
-	Factor de dilución:	10
-	Resultado final:	301

12. Interpretación de resultados

- Los resultados son definitivos a las 24h a 28h. Además los positivos para Enterococos observados antes de las 24h y los negativos observados después de las 28h también son válidos.

13. Validez de la prueba

El método debe cumplirse con estricto apego para que la prueba tenga la validez., e incluir al menos dos bacterias como control: *Enterococcus faecium* ATCC 35667 (control positivo), *Serratia marcescens* ATCC 43862 (control negativo), que sean tomados de las cepas de referencia por cada lote de muestras procesadas.

14. Medidas de seguridad

- Usar bata de laboratorio, cubre bocas, guantes estériles.
- Verificar que el lugar de trabajo esté limpio.
- Revisar que los reactivos y materiales para el proceso de las muestras estén completos y debidamente identificados.
- Lavarse las manos antes y después del proceso.

- Al término de uso de las cepas de trabajo, se desecharán de a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental- Salud ambiental- Residuos peligrosos biológicos- infecciosos- Clasificación y especificaciones de manejo.
- Descontaminar el material después de su uso de acuerdo a los procedimientos correspondientes.

15. Medidas de control de calidad

- Verificar la funcionalidad del proceso analítico mediante cepas control las cuales deberán demostrar pureza y viabilidad de las mismas.
- En el control de esterilidad anotar observaciones sólo en caso de presentar algún crecimiento en el medio.
- Lectura y registro de temperaturas de incubación con termómetros calibrados y verificados.
- Todos los equipos e instrumentos deberán estar incluidos en un programa de calibración, mantenimiento preventivo y verificación, de acuerdo a las características del equipo.

16. Apéndice

Box 16

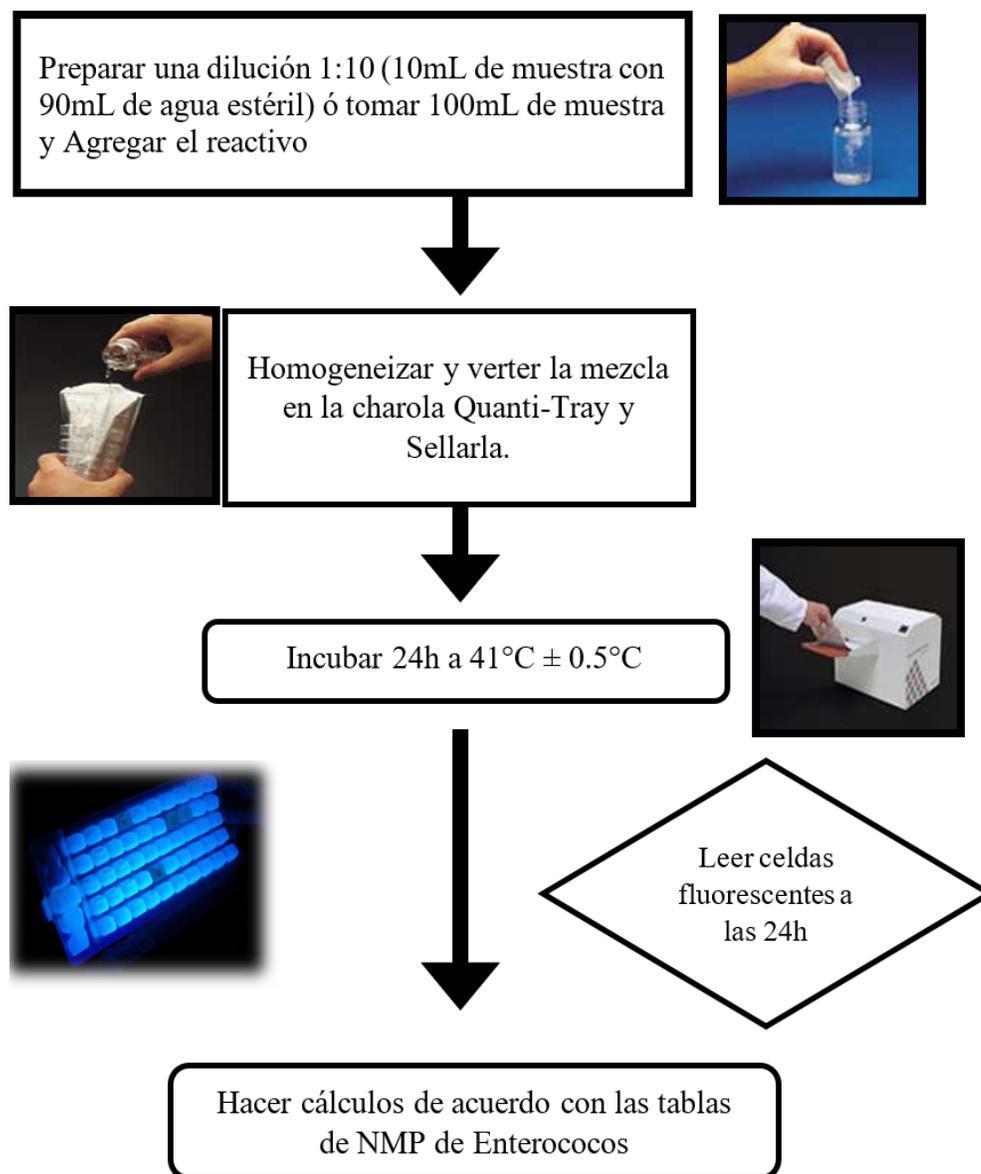


Figura 5

Determinación Enterococos

Capítulo II. Métodos de prueba para la determinación de Patógenos específicos

Método de prueba No. 1. Determinación cualitativa de *Salmonella* spp.

1. Introducción

La determinación de la presencia o ausencia de salmonella spp, en cierta cantidad de masa o volumen específico de producto, se lleva a cabo mediante etapas sucesivas, las cuales son: Pre-Enriquecimiento, Enriquecimiento Selectivo, Aislamiento en medios de cultivos selectivos y diferenciales, Identificación Bioquímica y confirmación Serológica de los microorganismos.

2. Objetivo

Determinar *Salmonella* spp. mediante su aislamiento en alimentos

3. Alcance

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

4. Referencia normativa

NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Apéndice Normativo A. Método de referencia para el aislamiento de *Salmonella* spp

5. Términos y definiciones

- Aislamiento: en este paso se utilizan medios sólidos que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a *Salmonella* y permite el reconocimiento visual de colonias sospechosas.
- Alimento: Cualquier sustancia o producto, sólido, semisólido o líquido, natural o transformado, que proporciona al organismo elementos para su nutrición.
- Cárnicos: es el producto pecuario de mayor valor. Posee proteínas y aminoácidos, minerales, grasas y ácidos grasos, vitaminas y otros componentes bioactivos, así como pequeñas cantidades de carbohidratos. Desde el punto de vista nutricional, la importancia de la carne deriva de sus proteínas de alta calidad, que contienen todos los aminoácidos esenciales, así como de sus minerales y vitaminas de elevada biodisponibilidad.
- Enriquecimiento Selectivo: empleado con el propósito de incrementar las poblaciones de *Salmonella* e inhibir otros organismos presentes en la muestra.
- Homogeneizar: Hacer que una cosa sea homogénea igualando o haciendo uniformes los elementos que la componen.
- Identificación Bioquímica: este paso permite la identificación genérica de los cultivos de *Salmonella* y eliminación de cultivos sospechosos falsos.
- Lácteos: El grupo incluye alimentos como la leche y sus derivados procesados (generalmente fermentados). Las plantas industriales que producen estos alimentos se caracterizan por la manipulación de un producto altamente perecedero, como la leche, que debe vigilarse y analizarse correctamente durante todos los pasos de la cadena de frío hasta su llegada al consumidor.
- Método de Prueba: Procedimiento técnico utilizado para la determinación de parámetros o características de un producto, proceso o servicio.
- Muestra: a la cantidad de material que posee todas las características físicas, fisicoquímicas, y microbiológicas del producto a evaluar.

- Producto de la pesca: Cualquier producto para consumo humano, derivado en parte o en su totalidad de los recursos de la flora y fauna acuáticas, sean peces, crustáceos, moluscos o equinodermos.
- Preenriquecimiento: es el paso donde la muestra es enriquecida en un medio nutritivo no selectivo, que permite restaurar las células de Salmonella dañadas a una condición fisiológica estable.
- Reactivo: (química) toda sustancia que interactúa con otra en una reacción química y que da lugar a otras sustancias de propiedades, características y conformación distinta, denominadas productos de reacción o simplemente productos.
- Salmonella: es un género de bacterias que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, formado por bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, con flagelos peritricos y que no desarrollan cápsula (excepto la especie *S. typhi*) ni esporas. Son bacterias móviles que producen ácido sulfhídrico (H₂S). Emplean glucosa por poseer una enzima especializada, pero no lactosa, y no producen ureasa ni tienen metabolismo fermentativo.
- Serotipificación: es una técnica serológica que permite la identificación específica de un cultivo.

6. Materiales, equipos e instrumentos

- Agitador vórtex
- Balanza analítica con capacidad adecuada y sensibilidad de 0.1g
- Baño de Agua que opere a 45°C + 2°C
- Baño de Agua de circulación o Incubadora que mantenga una temperatura de 41.5°C + 1°C
- Enfriador eléctrico de 2°C a 8°C
- Incubadora que mantenga una temperatura de 36°C + 1°C
- Homogeneizador peristáltico (Stomacher)
- Juego de pesas
- Lámpara de aglutinación con lupa
- Licuadora industrial de 2 velocidades
- Mechero Bunsen
- Microscopio
- Placa de calentamiento
- Termómetros Calibrados: Líquido en vidrio de 20-50°C y de -5-20°C con división mínima de 0.5°C
- Aplicadores de madera
- Asas bacteriológicas de 3 mm de diámetro
- Asas desechables ó de platino de 1mm de diámetro
- Asas rectas de platino
- Bolsas estériles para homogeneizador (Stomacher)
- Cajas de Petri estériles desechables
- Cubre bocas.
- Gasas
- Gradillas para tubos de 16 x 150 mm y 13 x 100mm
- Guantes desechables de látex
- Papel filtro
- Papel pH (intervalo de 6-8) con graduaciones máximas de 0.4 unidades
- Pipetas bacteriológicas de 10mL, 5mL y 1mL graduadas en 0.1mL protegidas con tapón de algodón.
- Pipetores
- Portaobjetos o placas de vidrio con anillos para serología
- Tubos de 16 x 150mm y 13 x 100mm
- Utensilios: Tenedores, Cucharas, cuchillos, charolas de aluminio, Pinzas y, hojas y mango de Bisturí
- Vasos de Licuadora

Nota: Todo el material que tenga contacto con las muestras se esterilizará en Horno durante 2 h a 170-175°C o 1 h a 180°C; o en autoclave durante 30 min a una temperatura de 121°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

7. Reactivos

- Agar Entérico de Hektoen (EH)
- Agar Hierro y Lisina (LIA)
- Agar Hierro y Triple Azúcar (TSI)
- Agar Nutritivo (AN): Agar Cerebro y Corazón (BAB), Agar Soya Tripticasa (AST) y Agar Cuenta Estándar (ACE)
- Agar Sulfito de Bismuto (ASB)
- Agar Urea
- Agar Verde Brillante (VB)
- Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD)
- Agua Peptonada Amortiguada (APAm)
- Alcohol etílico al 70%
- Antisuero polivalente de Salmonella somático O de los grupos A hasta el I más Vi.
- Caldo L-Lisina Descarboxilasa
- Caldo Lactosado (CL)
- Caldo Rojo de Metilo-Voges Proskauer (RM-VP)
- Caldo de Muller - Kauffmann Tetracionato Novobiocina (MKTTn)
- Caldo Soya Tripticaseina (CST)
- Caldo Triptona (T₁N₀)
- Caldo Rappaport – Vassiliadis con Soya (RVS)
- Caseína
- Discos impregnados de ONPG (O-Nitrofenil-β-D-Galactopiranosido)
- Leche Descremada Reconstituida (LDR)
- Reactivo de Kovac ó Erlich
- Solución de α-naftol al 6%.
- Solución de Ácido Clorhídrico (HCl) al 1N estéril
- Solución de Creatina (N-amidinosarcosina) al 0.5%
- Solución de Hidróxido de Potasio (KOH) al 40%
- Solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) al 1N estéril
- Solución Púrpura de bromocresol al 0.2%
- Solución de Yoduro de Potasio
- Solución Salina Fisiológica al 0.85%.
- Solución Verde Brillante al 0.1%
- Sulfato Ferroso
- Sulfato de Potasio (K₂SO₄)
- Tergitol / Aniónico estéril o Tritón X-100 estéril.
- Yodo

Nota: Los reactivos y medios de cultivo, se preparan según el fabricante

8. Fase Pre-analítica

8.1. Condiciones ambientales

La prueba se debe realizar a temperatura ambiental entre 18- 27°C y de 50-65% de humedad.

8.2. Preparación de la muestra

Verificar que el lugar de trabajo esté limpio, todos los reactivos y material para el proceso de las muestras este completo y debidamente identificado

Para obtener una submuestra para el análisis de muestras congeladas, descongelar en un baño de agua con temperatura controlada y flujo continuo a 45°C ± 2°C durante 15min, o mantener la muestra durante 18 h de 2 -5 °C.

Preparación de la muestra de acuerdo a su naturaleza:

- a) *Pre-enriquecimiento (procedimiento general para la preparación de muestras):*

Pesar asepticamente 25 g ó mL de la muestra y adicionar 225 mL del medio de pre-enriquecimiento estéril para obtener una dilución 1:10. Licuar u homogenizar durante un minuto.

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

En casos excepcionales, cuando es necesario analizar más de una porción de 25 g de un lote específico de alimento y teniendo evidencia de que si hay mezcla de tales porciones no afecta el resultado, las muestras pueden ser compuestas; es decir, si 10 muestras de 25 g serán examinadas, combinar las 10 porciones para obtener 250 g y adicionar 2.25 L del caldo de pre-enriquecimiento precalentado a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que para inocular el caldo selectivo RVS y MKTTn aumentarán las porciones de 10mL a 100mL teniendo que inocular 1mL y 10mL respectivamente.

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

b) *Procedimiento específico para la preparación de la muestra según el producto*

Para moluscos en concha, desconchados y congelados. Pesar el total de la muestra, máximo 200 g (carne y licor) y adicionar igual cantidad de APAm para obtener una dilución 1:2. Licuar por 2 min. Inocular a temperatura ambiente 50g del homogenizado (dilución 1:2) a 200 mL de APAm e incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$.

Productos que contienen cacao. Agregar al Agua Peptonada Amortiguada 50g/L de caseína (no usar caseína ácida) o 100g/L de leche descremada en polvo, incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 2h, añadir 0.018g/L de verde brillante. Continuar como se indica en el procedimiento analítico.

Productos ácidos y acidificantes. Asegurarse de que el pH no se encuentre por debajo de 4.5 durante el pre-enriquecimiento, puede utilizarse APAm a doble concentración. en caso de que se requiera subir el pH a más de 4.5 utilizando NaOH 1N, registrar esta cantidad para alcanzar un pH entre 5 -7. Continuar como se indica en el procedimiento analítico.

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

- *Limpieza de la concha.* Lavarse las manos con agua potable y jabón antes de comenzar. enjuagar el exceso de suciedad de las conchas y cepillar con un cepillo estéril, ocupando uno para la muestra completa; bajo el chorro de agua potable poniendo particular atención en las hendiduras de las conchas. Colocar las conchas limpias en toallas de papel absorbente o gasas limpias. Desechar los moluscos que tengan las conchas dañadas o con las valvas abiertas.
- *Remoción del contenido.* Lavarse las manos con agua, jabón y enjuagarse con alcohol al 70%. se puede utilizar guantes para evitar lesionarse. Sostener el molusco en la mano sobre una gasa dirigiendo la unión de las valvas o bisagra hacia el analista apoyándose sobre la mesa. Con un cuchillo desconchador estéril, insertar la punta entre las valvas y hacer palanca para cortar el músculo abductor. Drenar el licor de la concha dentro de un recipiente estéril. Cortar el músculo abductor de las conchas y vaciar el cuerpo del animal dentro del mismo recipiente. continuar como se indica en el procedimiento analítico.

Moluscos, desconchados y congelados. Pesar el total de la muestra, máximo 200 g (carne y licor) y adicionar igual cantidad de APAm para obtener una dilución 1:2. licuar por 2 min. Continuar como se indica en *el procedimiento analítico*.

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

Huevos

- i. **En cascarón.** Eliminar cualquier material ajeno adherido a la superficie del cascarón. desinfección del cascarón: preparar la solución desinfectante (1:3) que consiste en adicionar tres partes de una solución de etanol o isopropanol al 70% a una parte de solución de yodo/yoduro de potasio. Preparar una solución de alcohol al 70% diluyendo 700 mL de etanol al 100% hasta completar un volumen final de 1000 mL de agua destilada estéril o bien diluir 700 mL de alcohol al 95% con agua destilada estéril hasta completar un volumen final de 950 mL. La solución de yodo/yoduro de potasio se prepara como sigue: pesar 100 g de yoduro de potasio y disolver en 200 -300mL de agua destilada estéril. Adicionar 50 g de yodo y calentar suavemente con agitación constante hasta disolver el yodo. Disolver esta solución hasta completar un volumen final de 1000 mL de agua destilada estéril y almacenar en una botella ámbar con tapón de vidrio en la oscuridad. Sumergir los huevos en esta solución por al menos 10 s, sacarlos y dejar secar al aire. Cada muestra consiste de 20 huevos, en un total de 50 muestras por cada gallinero. Abrir los huevos en condiciones asépticas con guantes estériles y pasar a un recipiente estéril, cambiar guantes entre cada muestra. Evitar que fragmentos del cascarón caigan en el contenedor. Mezclar completamente las yemas y claras con una cuchara o cualquier otro instrumento estéril. mantener las muestras a temperatura ambiente (20-24°C) por 96h \pm 2h. después de este tiempo, tomar 25 mL o 25 g de la mezcla anterior y 25 mL de un CST de prueba (testigo) en un contenedor de 500 mL y agregar 225 mL de CST suplementado con sulfato ferroso (35 mg de sulfato ferroso a 1000 mL de CST). Mezclar bien por agitación. Dejar en reposo durante 60 min \pm 5min a temperatura ambiente. Mezclar nuevamente por agitación y determinar pH con papel indicador. Ajustar el pH, si es necesario, a 6.8 \pm 0.2. Incubar 24h \pm 2h a 36°C \pm 1°C. Continuar como se indica en el procedimiento analítico.
- ii. **Entero líquido** (homogeneizado). Combinar 15 porciones de 25 mL cada una para dar una muestra combinada de 375 mL en un matraz Erlenmeyer de 6l. Mantener esta mezcla a temperatura ambiente (20 - 25°C) por 96h \pm 2h. después de este tiempo, adicionar 3375 mL de CST suplementado con sulfato ferroso. Mezclar bien por agitación. Dejar en reposo durante 60 min \pm 5 min a temperatura ambiente. Mezclar nuevamente por agitación y determinar pH con papel indicador. Ajustar el pH, si es necesario, a 6.8 \pm 0.2. incubar 24h \pm 2h a 36°C \pm 1°C. Continuar como se indica en el procedimiento analítico.
- iii. **Cocido o Hervido** (de pollo, pato u otros). Si el cascarón del huevo se encuentra intacto, desinfectar como se describe en el inciso (i) y separar en condiciones asépticas el cascarón. pulverizar la yema y la clara y pesar 25 g en un matraz Erlenmeyer de 500 mL u otro recipiente apropiado. Agregar 225 mL CST (sin sulfato ferroso). Mezclar bien por agitación y continuar como se describe para huevo en cascarón. Continuar como se indica en el procedimiento analítico.

Leche descremada en polvo y caseína. Pesar 50 g de producto en 1 L de APAm, incubar a 36°C \pm 1°C por 24h \pm 2h, después de 2 h de incubación, adicionar 2 mL de solución verde brillante 1% si el alimento tiene alta probabilidad de estar contaminado con microbiota Gram positivo. Incubar durante 18h \pm 2h a 36°C \pm 1°C. Continuar como se indica en el procedimiento analítico.

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

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

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

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

Cebolla en hojuelas, cebolla en polvo, ajo en hojuelas. Pesar en condiciones asépticas, 25 g de muestra, en un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca, de 500 mL. Pre-enriquecer la muestra en CST adicionado con K_2SO_4 (5g de K_2SO_4 por 1000mL de CST, resultando una concentración final de 0.5% de K_2SO_4). Agregar el K_2SO_4 al caldo antes de esterilizar, distribuir en volúmenes de 225mL en matraces Erlenmeyer de 500mL esterilizar a 121°C por 15 min. Después de esterilizar, Determinar el pH asépticamente, ajustando de 5 a 7. Incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$. Continuar como se indica en el procedimiento analítico.

Pimienta de jamaica, canela, clavo y orégano. Hasta ahora, no se conocen métodos para neutralizar la toxicidad de estas cuatro especias. Lo que se recomienda para su análisis, es diluirlas más allá de su nivel tóxico. En el caso de la pimienta de jamaica, canela y orégano; preparar diluciones con una relación 1:100 muestra/CST; y para el clavo, una relación 1:1000. en el caso de condimentos en hojas secas, preparar diluciones cuya relación sea mayor a 1:10, debido a las dificultades que se han encontrado para que el caldo se absorba en productos deshidratados. Analizar estas especias como se describe para la pimienta negra, manteniendo las relaciones muestra/CST, recomendadas. Incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$. Continuar como se indica en el procedimiento analítico.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Melones. Preferentemente no descongelar las muestras antes del análisis. Si la muestra está congelada atemperar las muestras para obtener la porción analítica. Descongelar en un baño de agua con temperatura controlada con termostato, a $45^\circ\text{C} \pm 0.2^\circ\text{C}$ durante 15 min y con agitación constante, o descongelar manteniendo la muestra a $2\text{-}5^\circ\text{C}$ durante 18 h.

- *Para la fruta picada o cortada*, pesar 25 g en condiciones asépticas en un vaso de licuadora. Adicionar 225mL de APAm estéril y licuar por 2 min. Pasar el homogeneizado a un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca, de 500 mL o cualquier otro recipiente adecuado. Aflojar la tapa e incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar como se indica en el procedimiento analítico.
- *Fruta Entera*, no enjuagarlos aun si presentan tierra o suciedad visible. Analizarlos como estén. Colocar los melones en una bolsa de plástico estéril. Agregar suficiente APAm que permita que el melón flote. El volumen del APAm puede ser una y media veces el peso del melón. por ejemplo, los melones pesan 1500 g probablemente se necesitará un volumen de aproximadamente 2250 mL de APAm. Adicionar más APAm si es necesario. Colocar la bolsa de plástico con los melones y el agua en un vaso u otro contenedor de tamaño suficiente para sumergir los melones. doblar el extremo de la bolsa de plástico de forma segura pero no apretada para que permita el paso de aire durante la incubación. Incubar abriendo ligeramente la bolsa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar como se indica en el procedimiento analítico.

Mangos. De preferencia, no descongelar las muestras antes de su análisis. Si están congeladas, atemperar las muestras para obtener la porción analítica. Descongelar en un baño de agua con temperatura controlada y termostato, a $45^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ durante 15 min y con agitación constante, o descongelar manteniendo la muestra a $2-5^{\circ}\text{C}$ durante 18 h.

- *Para la fruta picada o cortada*, pesar 25 g en condiciones asépticas en un vaso de licuadora. Adicionar 225 mL de APAm estéril y licuar por 2 min. en condiciones asépticas, pasar el homogeneizado a un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca, de 500 mL o cualquier otro recipiente de tamaño suficiente para sumergir los mangos. Aflojar la tapa 1/4 de vuelta e incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar como se indica en el procedimiento analítico.
- *Fruta Entera.* No enjuagarlos aun si presentan tierra o suciedad visible. Analizarlos como estén. Colocar el mango en una bolsa de plástico estéril. Agregar suficiente APAm que permita que el mango flote. El volumen del APAm puede ser una vez el peso los mangos. por ejemplo, los mangos pesan 500g, probablemente se necesitará un volumen de aproximadamente 500 mL de APAm para que floten. Adicionar más APAm si es necesario. Colocar la bolsa de plástico con los mangos y el APAm en un vaso u otro contenedor de 5L. Incubar abriendo ligeramente la bolsa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar como se indica en el procedimiento analítico.

Tomates (tomates rojos o jitomates)

- *Para la fruta picada o cortada.* Pesar 25 g en condiciones asépticas en un vaso de licuadora. adicionar 225 mL de APAm estéril y licuar por 2 min. En condiciones asépticas, pasar el homogeneizado a un frasco estéril de boca ancha y tapa de rosca, de 500 mL o cualquier otro recipiente de tamaño adecuado para sumergir los tomates. Aflojar la tapa a 1/4 de vuelta e incubar durante $18\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Continuar como se indica en el procedimiento analítico.
- *Fruta Entera.* No enjuagarlos aun si presentan tierra o suciedad visible. Analizarlos como estén. Colocar los tomates en una bolsa de plástico estéril. Agregar suficiente APAm que permita que los tomates floten. El volumen del APAm puede ser una vez el peso de los tomates. por ejemplo, los tomates pesan 300 g probablemente se necesitará un volumen de aproximadamente 300 mL de APAm. Adicionar más APAm si es necesario. Colocar la bolsa de plástico con los tomates y el caldo en un vaso u otro contenedor adecuado. Doblar el extremo de la bolsa de plástico de forma segura pero no apretada para que permita el paso de aire durante la incubación. Incubar abriendo ligeramente la bolsa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$. Continuar como en el procedimiento analítico.

Muestras ambientales. Muestrear superficies ambientales con hisopos o esponjas estériles. Colocarlos en una bolsa estéril que contenga suficiente caldo Dey-Engley o solución de fosfatos para cubrir los hisopos o esponja. Transportar las muestras protegidas en un contenedor con paquetes de gel congelado para mantener las muestras frías, pero no congeladas. Si las muestras no pueden ser procesadas inmediatamente, refrigerarlas a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. analizar las muestras dentro de las siguientes $48\text{h} \pm 2\text{h}$ después de haber sido muestreadas, agregar a la bolsa o contenedor que contiene los hisopos o esponjas 225mL de APAm estéril. Agitar bien el contenido. cerrar el contenedor, mezclar, por movimientos circulares vigorosos, mantener a temperatura ambiente por $60\text{min} \pm 5\text{min}$.

Mezclar con movimientos circulares y medir el pH con papel indicador, cuando sea necesario ajustar el pH a 6.8 ± 0.2 , Aflojar la tapa o la boca de la bolsa e incubar durante $18h \pm 2h$ a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Continuar como se indica en el procedimiento analítico.

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

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

Filtración por membrana. Este método es recomendable para aguas con baja turbiedad. filtrar 1 L o más de la muestra de agua. Retirar la membrana y colocarla en 50mL de APAm. incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18h \pm 2h$. Continuar como se describe en el procedimiento analítico. *Nota:* para porciones grandes de APAm, precalentar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ antes de la inoculación de la muestra a analizar.

Enriquecimiento. Después del tiempo de incubación del preenriquecimiento seleccionado de acuerdo al tipo de matriz mencionado anteriormente, transferir 0.1 mL del cultivo de preenriquecimiento a un tubo del 10 mL de caldo RVS y 1 mL a un tubo conteniendo 10 mL de caldo MKTTn. Incubar el caldo RVS a $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24h \pm 3h$ en baño de agua de circulación y el caldo MKTTn (adicionando 0.2 mL de Yodo-Yoduro) a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24h \pm 3h$ en incubadora.

Nota: Para todos los casos, correr simultáneamente muestras control (positivo, negativo y atípico).

9. Fase analítica

a) Aislamiento:

Inocular a partir de los cultivos anteriores, 3 medios selectivos en placa como sigue: Mezclar cada tubo y estriar por cada uno en una serie de cajas en agar XLD, ASB y EH o VB. Incubar las placas $24h \pm 3h$ a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Examinar las placas para investigar la presencia de colonias típicas de *Salmonella*, de acuerdo a las siguientes características:

- Agar XLD: Colonias rosas con o sin centro negro. Muchos cultivos de *Salmonella spp* pueden producir colonias con un centro negro grande o completamente negras.
- Agar EH: Colonias azul-verdes o azules, con o sin centro negro. Muchos cultivos de *Salmonella spp* pueden producir colonias con un centro negro grande o completamente negras.
- Agar SB: las colonias típicas pueden ser cafés, grises o negras, con o sin brillo metálico. Generalmente el medio circundante (halo) es café tornándose posteriormente negro. Después de haber sido incubadas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24h \pm 3h$ o hasta 48 h.
- Agar VB: colonias incoloras rosadas o fucsia, transparentes u opacas sobre el medio coloreado de rosado o rojo, las bacterias fermentadoras de lactosa dan colonias amarillas.

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

- Agar XLD y EH: Muy pocos cultivos atípicos de *Salmonella spp*, producen colonias rosas salmón o amarillas respectivamente con o sin centro negro. Seleccionar 2 o más colonias atípicas. Existen algunas cepas con un comportamiento bioquímico diferente al resto del género, por ejemplo *S. paratyphi A* al crecer en XLD genera colonias rosas con el centro más oscuro y no produce H₂S. Otras atípicas producen ácido a partir de la lactosa y al crecer en XLD dan colonias amarillas con o sin el centro negro.
- Agar SB: algunos cultivos producen colonias verdes con un halo oscuro muy pequeño. Si después de 48h de incubación no hay colonias típicas, seleccionar 2 o más atípicas.

b) *Identificación bioquímica:*

Para la confirmación, tomar de cada agar selectivo al menos 1 colonia considerada como típica o en total 3 colonias sospechosas si no existe la primera posibilidad. En casos epidemiológicos, identificar al menos 5 colonias sospechosas, si en una placa se encuentra menos de 5 colonias típicas o sospechosas, confirmar todas las colonias que se encuentren en el medio. Estriar cada colonia seleccionada en cualquier agar nutritivo, preferiblemente sin agua de condensación, de tal manera que permita el aislamiento de colonias. Incubar las placas inoculadas a $36^{\circ}\text{C} + 1^{\circ}\text{C}$ por 24h + 3h.

Posterior a la incubación, se inocula una primera parte de bioquímicas conformada por: TSI (por estría en la superficie inclinada y por punción en el fondo) y LIA (por estría en la superficie inclinada y doble punción en el fondo), Agar UREA (por estría en la superficie inclinada y por punción en el fondo) y Agar Nutritivo, incubando a $36^{\circ}\text{C} + 1^{\circ}\text{C}$ por 24h + 3h. Almacenar las placas de agar mientras se concluye el análisis.

De obtener reacciones características a *salmonella*, continuar con la confirmación serológica a partir del agar nutritivo de la misma cepa y concluir la prueba si ésta aglutina. De no aglutinar; continuar con una segunda parte de bioquímicas adicionales hasta concluir la prueba.

De haber obtenido reacciones indeterminadas en TSI y LIA, se consideran como cultivos presuntivos; continuar con una segunda parte de bioquímicas adicionales y realizar la confirmación serológica.

Estas bioquímicas adicionales son:

- Caldo L-lisina Descarboxilasa. Si la prueba de LIA fue satisfactoria, no es necesario repetirla. Si la reacción de LIA fue dudosa, inocular el caldo con pequeña cantidad de cultivo. Cerrar la tapa fuertemente e incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24h \pm 3h. Si el medio aparece descolorido (ni púrpura, ni amarillo), agregar unas gotas de colorante púrpura de bromocresol al 0.2% y leer nuevamente la reacción.
- ONPG: Detección de β -galactosidasa. consiste en el Método de Discos Impregnados: hacer una suspensión densa del cultivo en un tubo de bioquímica estéril de 13x100 mm que contenga. 0.1 mL de solución salina fisiológica estéril al 0.85%, añadir el disco impregnado con el reactivo y agitar suavemente.
- Prueba de Indol: Simultáneamente se siembran el caldo T₁N₀. Verificar crecimiento observando desarrollo en el tubo. Para llevar a cabo la prueba de Indol: añadir 0.2mL a 0.3 mL del reactivo de Kovac al tubo del caldo. El desarrollo de un color rojo intenso, indica una prueba POSITIVA, si el color es amarillo indica que es NEGATIVA para Indol.
- Prueba de Voges-Proskauer: Se siembra un tubo con 3 mL del cultivo. Para realizar la prueba, 2 gotas de solución de creatina, 3 gotas de solución de alfa naftol y al final 2 gotas de solución de hidróxido de potasio al 40%. Agitar después de cada reactivo. Prueba positiva: desarrollo de color rojo ladrillo. Prueba negativa: sin cambio de color o amarillo.

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

c) *Pruebas serológicas:*

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

- Detección de los antígenos Poly A-I & Vi. Empleando una colonia pura no autoaglutinable, proceda, empleando una gota de la solución salina en una lámina de vidrio, disperse con el asa hasta obtener una suspensión homogénea y agregue una gota del antisuero O. Si se produce aglutinación, la reacción se considera positiva del antisuero O en lugar de la solución salina.

10. Fase Post-Analítica

a) Desecho de residuos

Se desecharán de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

b) Lavado de material

Lavar el material utilizado en la determinación conforme al Procedimiento interno para el Aseguramiento de la Calidad de los Resultados Analíticos.

11. Cálculos

No aplica

12. Interpretación de resultados

- Agar TSI: en el fondo del tubo se observa el viraje del indicador (amarillo) debido a la fermentación de la glucosa en anaerobiosis; 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 por aerobiosis. En la mayoría de los casos se observa coloración negra a lo largo de la punción debido a la producción de ácido sulfhídrico que precipita como sulfuro férrico al reaccionar con el hierro. Cuando la fermentación da lugar a la formación de bióxido de carbono, éste puede ser fácilmente observado por la producción de gas: burbujas en el medio. Cuando alguna *Salmonella spp* lactosa positiva es aislada, el agar TSI se torna completamente amarillo.
- Agar LIA: se observa intensificación del color púrpura en todo el tubo por la descarboxilación de la lisina que se lleva a cabo en anaerobiosis y la desaminación de la lisina la cual es en aerobiosis. Considerar negativos aquellos cultivos que produzcan claramente un 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. Cuando la fermentación da lugar a la formación de bióxido de carbono, éste puede ser fácilmente observado por la producción de gas: burbujas en el medio. Todos los cultivos que den reacción alcalina en el fondo del medio, independientemente de la reacción que hayan dado en TSI, deben retenerse como aislamientos presuntivos de *Salmonella spp* para someterlos a pruebas bioquímicas adicionales y pruebas serológicas.
- -Caldo Urea: no se observa el viraje de coloración del medio. Descartar todos los cultivos que den ureasas positivas (color fucsia). Retener los cultivos que den la prueba negativa.
- Caldo L-lisina Descarboxilasa: las especies de *Salmonella spp* dan reacción alcalina por descarboxilación de la lisina (color púrpura del medio). La prueba negativa se interpreta por un color amarillo del medio.
- Prueba de Indol [en Caldo Triptona (T₁N₀): Prueba positiva: desarrollo de un anillo de color rojo. Prueba negativa: desarrollo de un anillo de color amarillo
- ONPG: Detección de β-galactosidasa: Prueba positiva: Color amarillo; Prueba negativa: incoloro
- Caldo RM-VP: Prueba de Voges-Proskauer (VP): Prueba positiva: desarrollo de color rojo ladrillo; Prueba negativa: desarrollo de color amarillo

Consultar la tabla 3 para mayor entendimiento.

Los cultivos determinados como presuntivos con las pruebas bioquímicas y confirmados por la serología, informar como: *Salmonella spp* en 25g: PRESENCIA.

Descartar los cultivos con resultados atípicos a partir de las pruebas bioquímicas y/o bioquímicas miniaturizadas clasificadas como no *Salmonella* spp, informar: *Salmonella* spp en 25g: AUSENCIA.

Placas con agar XLD, ASB y el tercer medio selectivo sin desarrollo y/o colonias atípicas, informar: *Salmonella* spp en 25g: AUSENCIA.

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

Para los casos en los que se analiza una pieza de producto reportar como Presencia o Ausencia por piezas analizadas.

Box 17

Tabla 3

Interpretación bioquímica de *Salmonella* spp.

Bioquímica	Característica de <i>Salmonella</i>		
	Típica	Atípicas	
	(Ejm: <i>typhimurium</i>)	(Ejm: <i>diarizonae</i>)	(Ejm: <i>abortus equi</i>)
TSI	K/ A ^S (rojo/amarillo y negro)*	K/ A ^S (rojo/amarillo y negro)*	A/ A (amarillo/amarillo)*
LIA	K/ K ^S (púrpura/púrpura y negro)*	K/ K ^S (púrpura/púrpura y negro)*	K/ K ó N (púrpura/púrpura ó neutro)*
UREA	NEGATIVO (Sin cambio)	NEGATIVO (Sin cambio)	NEGATIVO (Sin cambio)
L-LISINA	POSITIVO (púrpura)	POSITIVO (púrpura)	POSITIVO (púrpura)
INDOL	NEGATIVO (halo amarillo)	NEGATIVO (halo amarillo)	NEGATIVO (halo amarillo)
ONPG	NEGATIVO (incoloro)	POSITIVO (amarillo)	NEGATIVO (incoloro)
VOGES PROSKAUER	NEGATIVO (caldo teñido de amarillo)	NEGATIVO (caldo teñido de amarillo)	NEGATIVO (caldo teñido de amarillo)
POLIVALENTE	POSITIVO (Aglutinado)	NEGATIVO (Sin Aglutinar)	POSITIVO (Aglutinado)

A: ácido K: alcalino s: sulfuro * : A veces con gas

Autoría propia: 2024

Fuente de consulta: [NOM-210-SSA1-2014](#)

13. Validez de la prueba

El método debe cumplirse con estricto apego para que la prueba tenga la validez. Además del cultivo control positivo *Salmonella Typhimurium* ATCC14028 y el control negativo *Citrobacter freundii* ATCC, deben usarse controles adicionales para ayudar a la selección de colonias atípicas. Se recomiendan: *S. diarizonae* (ATCC 12325), lactosa positivo, H₂S positivo y *S. abortus equi* (ATCC 9842), lactosa-negativo, H₂S-negativo; o *S. diarizonae* (ATCC 29934) lactosa-positivo, H₂S-negativo.

14. Medidas de seguridad

- Usar bata de laboratorio, cubre bocas, guantes estériles.
- Verificar que el lugar de trabajo esté limpio.
- Revisar que los reactivos y materiales para el proceso de las muestras estén completos y debidamente identificados.
- Lavarse las manos antes y después del proceso.
- Al término de uso de las cepas de trabajo, se desecharán de a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental- Salud ambiental- Residuos peligrosos biológicos- infecciosos- Clasificación y especificaciones de manejo.
- Descontaminar el material después de su uso de acuerdo a los procedimientos correspondientes.

15. Medidas de control de calidad

- Verificar la funcionalidad del proceso analítico mediante cepas control las cuales deberán demostrar pureza y viabilidad de las mismas.

- En el control de esterilidad anotar observaciones sólo en caso de presentar algún crecimiento en el medio.
- Lectura y registro de temperaturas de incubación con termómetros calibrados y verificados.
- Todos los equipos e instrumentos deberán estar incluidos en un programa de calibración, mantenimiento preventivo y verificación, de acuerdo a las características del equipo.

16. Apéndice

Box 18

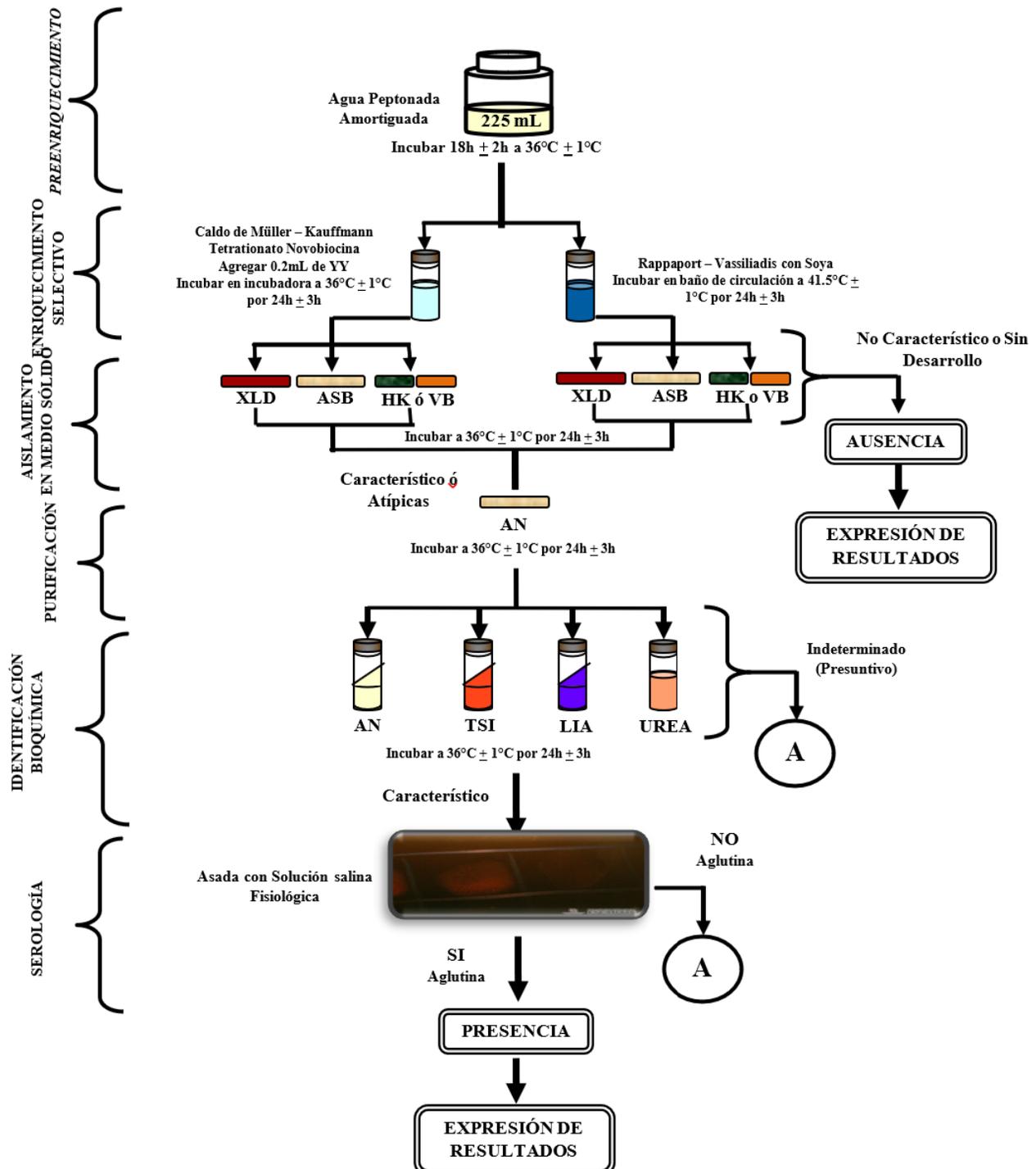


Figura 7

Diagrama del aislamiento de *Salmonella* spp.

Nota: Se puede utilizar API20 como prueba alternativa para la identificación bioquímica

Fuente: *Elaboración propia*, 2024

Box 19

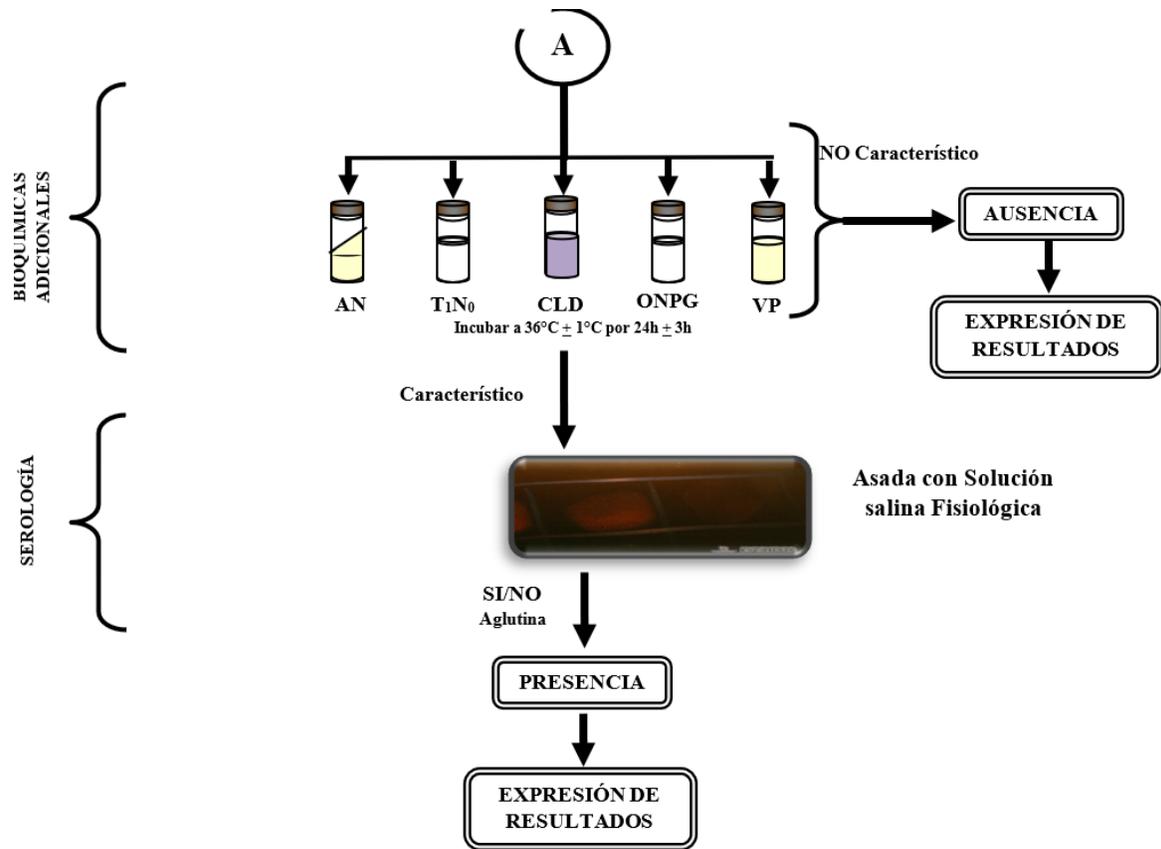
**Figura 8**

Diagrama complementario del aislamiento de *Salmonella* spp.

Fuente: *Elaboración propia*

Método de prueba No. 2. Determinación de densidad microbiana de *Escherichia coli* por el Número Más Probable (NMP)

1. Introducción

Este método se basa de acuerdo con la naturaleza de la muestra:

La propiedad de la *E. coli* para producir gas como resultado de la fermentación de la Lactosa y en la mayoría de los casos se acompaña de turbidez en todo el caldo de incubación, manifestándose en las pequeñas campanas Durham y su identificación en presencia de Fluorescencia debido a la enzima beta-glucuronidasa (GUD) en contacto con el sustrato 4-metilumbelliferyl-beta-D-glucorónido (MUG); enriquecimiento mediante la inoculación en caldo Glutamato con Minerales Modificado, y la confirmación de la presencia mediante la siembra de tubos con producción de ácido en agar 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D glucurónido, para detectar la actividad de β -glucuronidasa.

2. Objetivo

Describir la técnica para estimar la densidad microbiana de *Escherichia coli* por la técnica del Número Más Probable (NMP) de bacterias viables en muestras de aguas y alimentos.

3. Alcance

Aplicable para todos los Productos Lácteos, Cárnicos, de la Pesca, Alimentos Preparados y aguas de uso y consumo humano.

4. Referencia normativa

NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Apéndice Normativo H. Método aprobado para la estimación de la densidad de Coliformes Totales, Fecales y *E. coli* por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua. Apéndice Normativo I. Método aprobado para la estimación de la densidad de *E. coli* por la técnica del NMP, para productos de la pesca.

5. Términos y definiciones

- Agua para uso y consumo humano (potable): agua que no contiene contaminantes objetables, químicos o agentes infecciosos y que no causa efectos nocivos para la salud.
- Agua potable: aquella cuyo uso y consumo no causa efectos nocivos al ser humano, para lo cual debe cumplir con los requisitos que establece el Reglamento y la Norma Oficial Mexicana correspondiente.
- Crustáceos: Organismo acuático invertebrado cubierto por un caparazón o caparazón quitinoso; ejemplo, camarón.
- Cultivo microbiano: Método para la multiplicación de microorganismos, tales como bacterias, hongos y parásitos, en el que se prepara un medio óptimo para favorecer el proceso deseado. Un cultivo es empleado como un método fundamental para el estudio de las bacterias y otros microorganismos que causan enfermedades en medicina humana y veterinaria.
- Dilución decimal: 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.
- Diluciones decimales adicionales: 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.

- *E. coli*: Es la especie bacteriana más común de la microbiota intestinal; se presenta como un comensal del intestino humano pocas horas después del nacimiento. Es raro encontrar cepas comensales asociadas a enfermedad, pero existen varios serotipos de *E. coli* implicados en un amplio espectro de enfermedades agrupados en tres síndromes clínicos.
- Fluorescencia: Fenómeno por el cual algunas sustancias tienen la capacidad de absorber luz a una determinada longitud de onda, por lo general en el rango ultravioleta, emiten luz en una longitud más larga. Absorben fotones con una determinada energía, y liberan fotones con menor energía.
- Molusco bivalvo: todas las especies de moluscos lamelibranquios que se alimentan por filtración, que cuentan con dos valvas, ejemplo ostiones, mejillones o almejas.
- Muestra: cantidad de material que posee todas las características físicas, fisicoquímicas y microbiológicas del producto a evaluar.
- Número Más Probable (NMP): término que debe utilizarse para reportar Coliformes.
- Población microbiana: Definida por dos parámetros que suelen referirse a la unidad de volumen del medio, la Densidad Microbiana o masa celular y la Concentración Celular o número de células. El aumento de estos dos parámetros constituye el fenómeno del crecimiento.
- Sustrato fluorogénico: Molécula sobre la que actúa una enzima, y el sustrato tendrá propiedades fluorescentes.

6. Materiales, equipos e instrumentos

- Balanza analítica digital con capacidad adecuada y sensibilidad de 0.1 g.
- Baño de agua con recirculación continua, tapa de dos aguas y termostato que evite variaciones mayores a 0.1°C a una temperatura de $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$.
- Enfriador eléctrico para el guardado de los medios.
- Gabinete de Luz UV
- Homogeneizador peristáltico (Stomacher)
- Incubadora de $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.
- Incubadora de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Incubadora de $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Licuadora industrial de 2 velocidades
- Mecheros Bunsen.
- Motor de licuadora industrial
- Termómetros de inmersión total con división mínima de 0.5°C calibrado y/o verificado.
- Termómetros de inmersión de $22-55^{\circ}\text{C}$ con subdivisiones de 0.1°C calibrado y/o verificado.
- Asa de platino de aproximadamente de 3mm y 5 mm de diámetro
- Batas
- Bolsas para Stomacher.
- Cajas de Petri estériles
- Campanas de fermentación Durham.
- Charolas chicas de aluminio
- Cubre bocas.
- Gasas.
- Goggles
- Gradillas para tubos de 20 x 200mm, 16 x 150 mm y 13 x 100mm
- Guantes desechables de látex.
- Pipetas bacteriológicas de 10mL y 5mL graduadas en 0.1mL protegidas con tapón de algodón.
- Pipetores.
- Probetas de 100 mL y 500 mL.
- Recipientes de plástico de boca ancha con tapa de rosca de 500 mL para contener las muestras
- Tubos de 20 x 200 mm, 16 x 150 mm y 13 x 100 mm.
- Vasos de licuadora estériles
- Vaso de precipitado de 500 mL.
- Utensilios: Cucharas, tenedores, cuchillos y hojas de bisturí.

Nota: Todo el material que tenga contacto con las muestras se esterilizará en Horno durante 2 h a 170-175°C o 1 h a 180°C; o en autoclave durante 30 min a una temperatura de 121°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.

7. Reactivos

- Agar Eosina Azul de Metileno de Levin (EMB-L)
- Agar Citrato de Simmons
- Base de Agar Sangre (BAB) al 2% de NaCl
- Caldo EC + MUG
- Caldo Glutamato con minerales Modificado (MMGB)
- Caldo Lauril + MUG
- Caldo Lauril de concentración doble
- Caldo Triptona (T₁N₀)
- Reactivo de Kovac o Erlich
- RM-VP (Rojo de Metilo-Voges Proskauer)
- Solución de α -naftol
- Solución de Hidróxido de Potasio al 40% (KOH)
- Solución de Peptona Salina (SPS)
- Solución de Rojo de Metilo
- Solución Reguladora de Fosfatos (Buffer)
- X-glucurónido “5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucurónido” (TBX)

Nota: Los reactivos y medios de cultivo, se preparan según el fabricante.

8. Fase Pre-analítica

8.1. Condiciones ambientales

La prueba se debe realizar a temperatura ambiental entre 18- 27°C y de 50-65% de humedad.

8.2. Preparación de la muestra

Verificar que el lugar de trabajo esté limpio, todos los reactivos y material para el proceso de las muestras este completo y debidamente identificado

9. Fase analítica

a) *Determinación de E. coli en alimentos refrigerados y congelados por sustrato fluorogénico e identificación bioquímica.*

Pesar 25 g del alimento en 225 mL de regulador de fosfatos. Mezclar en el homogeneizador peristáltico de 1 - 2 min a 230 rpm. Esta se considera la dilución 1:10.

- Prueba presuntiva. De la dilución primaria transferir 1 mL a cada uno de los 3 tubos de bioquímica de 16 x 150mm los cuales contengan 10mL de Caldo Lauril + MUG de concentración sencilla con campanas de fermentación Durham en su interior. Verificar que estos últimos no contengan burbuja antes de meter a incubación. Realizar por lo menos 2 diluciones y series de tubos consecutivas. Inocular un tubo con una cepa de *E. coli* como control positivo y otro tubo con *Enterobacter aerogenes* como control negativo, para facilitar la diferenciación entre los tubos que presenten solo crecimiento y crecimiento con fluorescencia. Incubar los tubos en la estufa de 24 - 48 + 2 hrs a 35°C. Examinar si hay formación de gas, turbidez y fluorescencia. Anotar resultados presuntivos. Considerar que la florescencia se puede presentar a las 48 h de incubación.
- Prueba confirmativa. De cada tubo que muestre fluorescencia se tomará una azada y se estiará en placas de EMB-L, incubar las cajas invertidas a 35 + 1°C por 24hrs. Seleccionar 2 colonias de cada placa con la siguiente morfología: colonias con centro negro, planas con o sin brillo metálico verdoso y sembrar en BAB (Base de Agar Sangre) e incubar a 35°C por 18 -24hrs, así mismo realizar la identificación bioquímica o prueba IMViC (Indol, Rojo de Metilo, Voges Proskauer, Citrato), utilizando T₁N₀, RM-VP y Citrato de Simmons respectivamente:

- Caldo Triptona (T₁N₀): se inocula un tubo del caldo (para la prueba de Indol). Se incuba a 35 ± 0.5°C por 24 + 2hrs.
- Caldo RM-VP: Se inoculará un tubo con el medio. Incubar 48h ± 2hrs a 35 ± 2°C.
- Citrato de Simmons: se inoculará por estría el tubo y se incubará 48 h a 35°C.

b) *Determinación de E. Coli para productos de la pesca dependiendo de su naturaleza*

Rebanadas y filete de Pescados: tomar una porción representativa de la muestra y diluir (10 g en 90 mL de diluyente).

Moluscos bivalvos y gasterópodos: en caso de animales en concha, se debe tener un mínimo de 10 - 12 ostiones a fin de obtener una muestra representativa y permitir la selección de animales completos disponibles para su desconche, obteniéndose aproximadamente 100 g de licor y carne; descartar moluscos con valvas abiertas. Con moluscos pequeños usar más piezas hasta obtener el peso adecuado. Adicionar un volumen o peso equivalente de PBS. Homogeneizar por 90 segundos, esto constituye una dilución 1:2.

Crustáceos como gambas, langostinos y langostas: remover la cabeza y la cola antes del análisis de la carne del cuerpo y homogeneizar con la cantidad adecuada del diluyente (1:10).

Cefalópodos: Remover la piel y ventosas con pinzas y bisturí, tomar porciones del musculo dorsal y de los tentáculos, adicionar diluyente para una dilución 1:10.

Prueba presuntiva para productos de la pesca. De la dilución primaria transferir 1 mL a cada uno de los 3 tubos de bioquímica, los cuales contengan 10 mL de Caldo MMGB de concentración sencilla. Realizar por lo menos 2 diluciones y series de tubos consecutivas.

Inocular un tubo con una cepa de E. coli como control positivo y otro tubo con *Enterococos faecalis* como control negativo y un control de esterilidad para facilitar la diferenciación entre los tubos. Incubar en la estufa a 37°C + 1°C por 24 + 2h.

Prueba confirmativa para productos de la pesca. De cada tubo que muestre presencia de coloración amarilla; se tomará una muestra con el asa y se estriará en placas de TBX. Incubar las cajas invertidas a 44°C + 1°C por 22h + 2h. Después del período de incubación, observar la presencia de colonias de cualquier tono azul (oscuro o pálido).

10. Fase Post- analítica

a) *Desecho de residuos*

Se desecharán de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

b) *Lavado de material*

Lavar el material utilizado en la determinación conforme al Procedimiento interno para el Aseguramiento de la Calidad de los Resultados Analíticos.

11. Cálculos

Calcular la densidad microbiana en Número Más Probable de Coliformes fecales consultando las tablas correspondientes de acuerdo con la serie de tubos empleados. Las tablas de resultados se encuentran en la NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos, mismo que también se anexan a este método de prueba.

12. Interpretación de resultados

Considerar las siguientes reacciones bioquímicas para la interpretación de la tabla 6:

- Caldo Triptona (T₁N₀): Para llevar a cabo la prueba de Indol: añadir 5 a 7 gotas del reactivo de Kovac al tubo del caldo (con o sin crecimiento). El desarrollo de un color rojo intenso en la superficie, constituye una prueba POSITIVA para Indol.
- Caldo RM-VP: Realizar prueba como se indica:
 - Prueba de Voges-Proskauer (VP): Transferir a un tubo 1 mL del cultivo de 48 h. Adicionar 0.6 mL de solución de alfa naftol y 0.2 mL de solución de hidróxido de potasio al 40% y agitar. Se considera una prueba positiva cuando se desarrolla un color rojo rosado de 15 - 30 min.
 - Prueba de Rojo de Metilo (RM): Adicionar al sobrante del tubo, 5 gotas de solución de rojo de metilo. Se considera una prueba positiva cuando se desarrolla un color rojo. Un color amarillo definido es una prueba negativa.
- Citrato de Simmons: Una prueba positiva se observa mediante crecimiento y un cambio a coloración azul; la ausencia de crecimiento o vire del medio se considera una prueba negativa.

Para el inciso (a) de la fase analítica, distinguir de las bioquímicas que presenten característico en las siguientes combinaciones para el IMViC:

Box 20

Tabla 4

Reacciones características de *E. coli* en la prueba IMViC

Pruebas:	Biotipo 1*	Biotipo 2*
Indol:	+	-
RM:	+	+
VP:	-	-
Citrato:	-	-
*Son considerados como <i>E. coli</i>		

Fuente de Consulta: NOM-210-SSA1-2014

Para el inciso (b) de la fase analítica, se considera como positivo cada tubo del cual se obtenga colonias azules a azul-verdes en la placa del medio selectivo. Contar por cada dilución el número de tubos positivos en el medio.

Expresar en NMP/g ó mL para alimentos y NMP/100g ó mL para las aguas directas o muestras que requieran una dilución (1:2).

13. Validez de la prueba

El método debe cumplirse con estricto apego para que la prueba tenga la validez., e incluir al menos dos bacterias como control, pudiendo ser: *Escherichia coli* LEM 01005, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, que sean tomados de las cepas de referencia por cada lote de muestras procesadas

14. Medidas de seguridad

- Usar bata de laboratorio, cubre bocas, guantes estériles.
- Verificar que el lugar de trabajo esté limpio.
- Revisar que los reactivos y materiales para el proceso de las muestras estén completos y debidamente identificados.
- Lavarse las manos antes y después del proceso.
- Al término de uso de las cepas de trabajo, se desecharán de a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental- Salud ambiental- Residuos peligrosos biológicos- infecciosos- Clasificación y especificaciones de manejo.
- Descontaminar el material después de su uso de acuerdo a los procedimientos correspondientes.

15. Medidas de control de calidad

- Verificar la funcionalidad del proceso analítico mediante cepas control las cuales deberán demostrar pureza y viabilidad de las mismas.

- En el control de esterilidad anotar observaciones sólo en caso de presentar algún crecimiento en el medio.
- Lectura y registro de temperaturas de incubación con termómetros calibrados y verificados.
- Todos los equipos e instrumentos deberán estar incluidos en un programa de calibración, mantenimiento preventivo y verificación, de acuerdo a las características del equipo.

16. Apéndice

Box 21

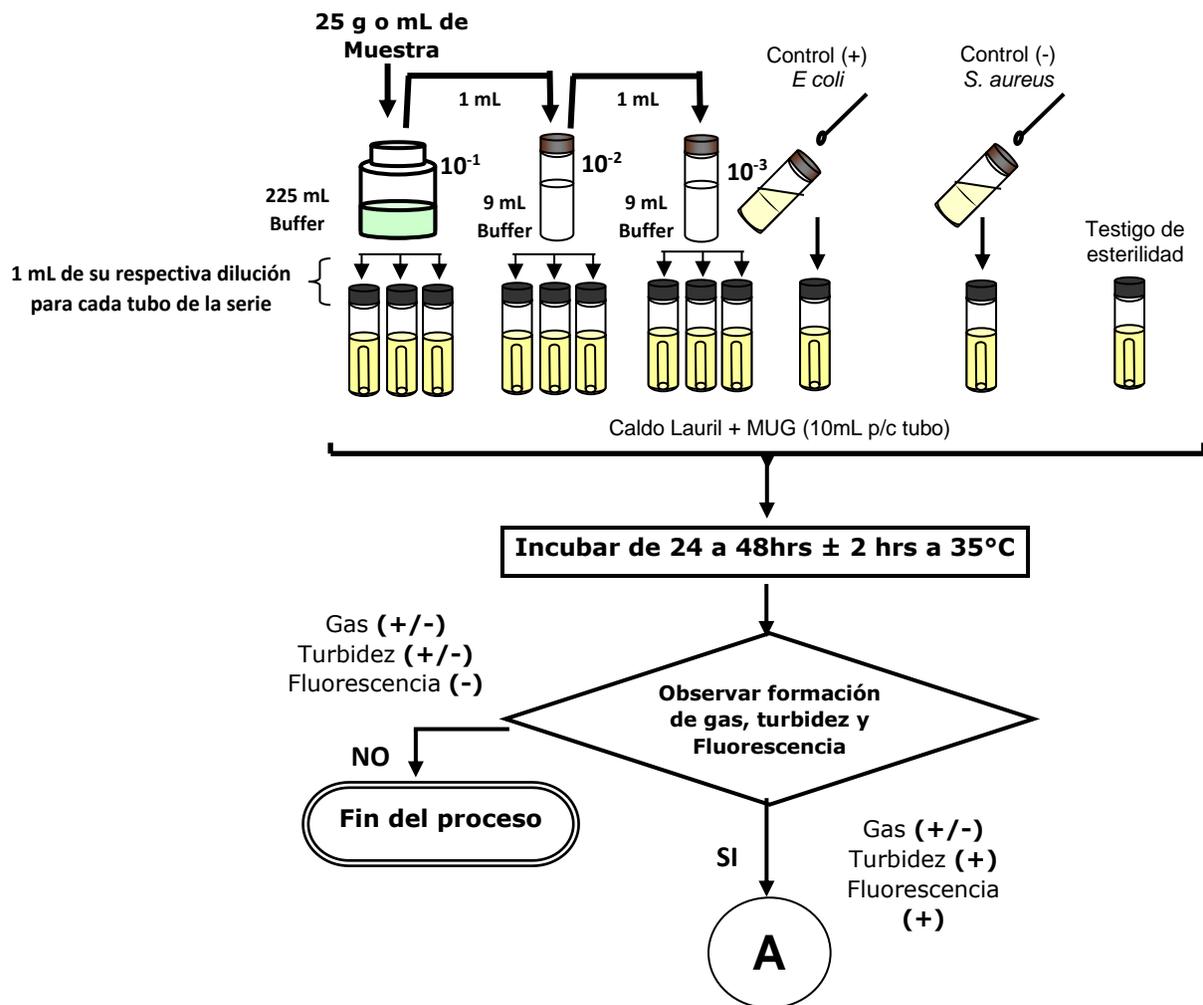


Figura 8

Diagrama para *detección E. coli* para muestras de alimentos

Fuente: *Elaboración propia, 2024*

Box 22

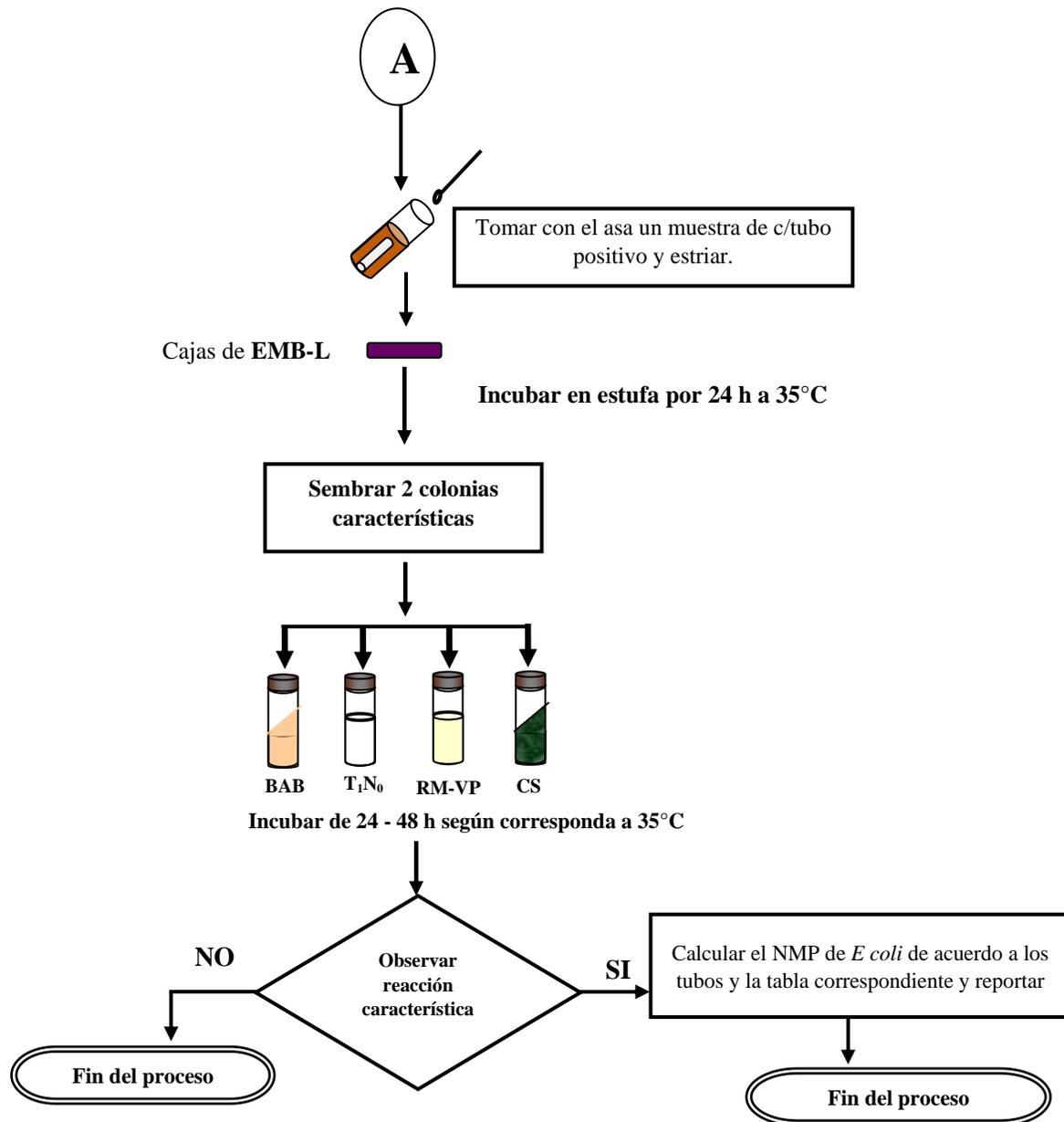


Figura 9

Diagrama para detección *E. coli* para muestras de alimentosFuente: *Elaboración propia, 2024*

Box 23

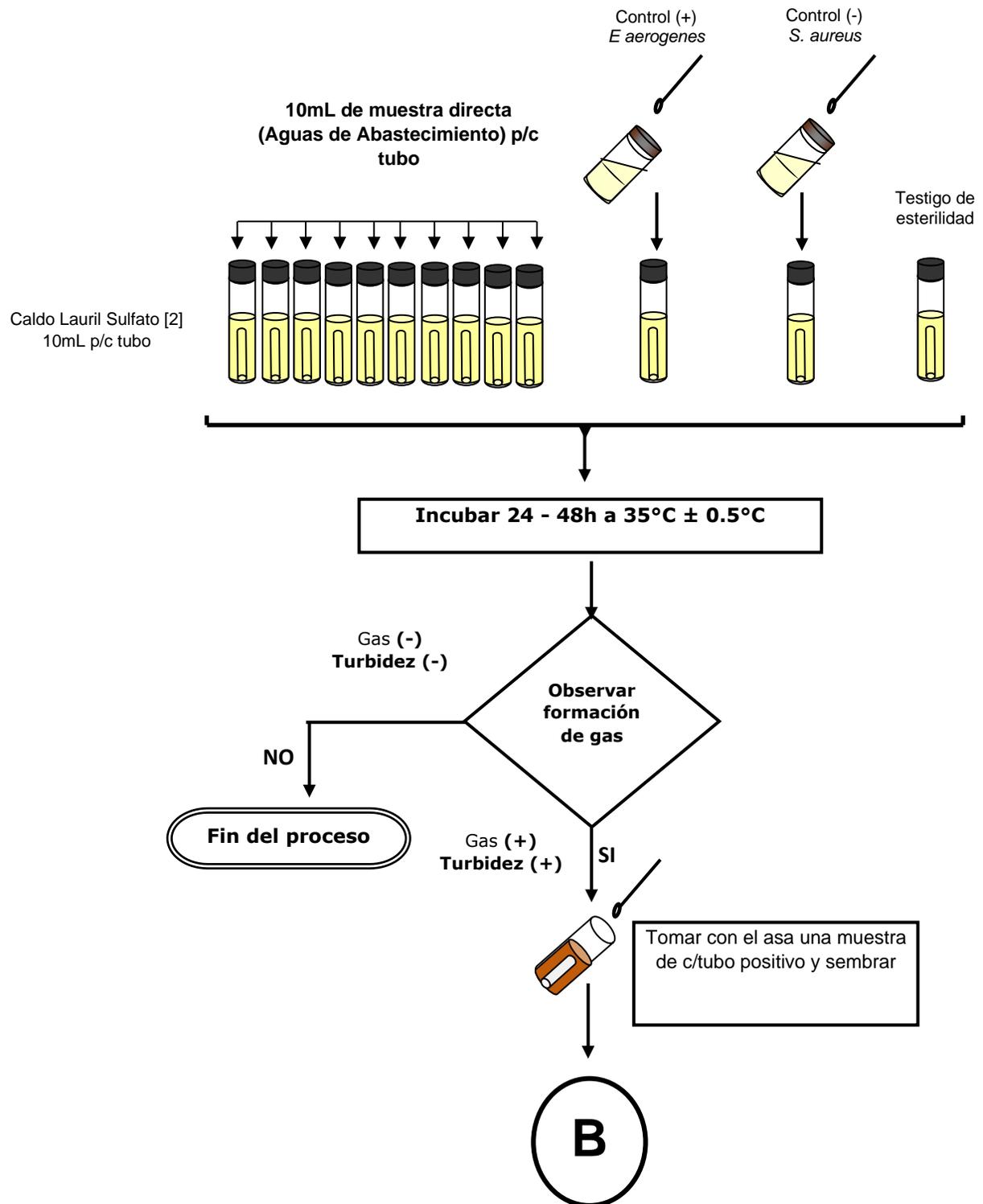


Figura 10

Diagrama de *E. coli* para aguas de uso y consumo humanoFuente: *Elaboración propia, 2024*

Box 24

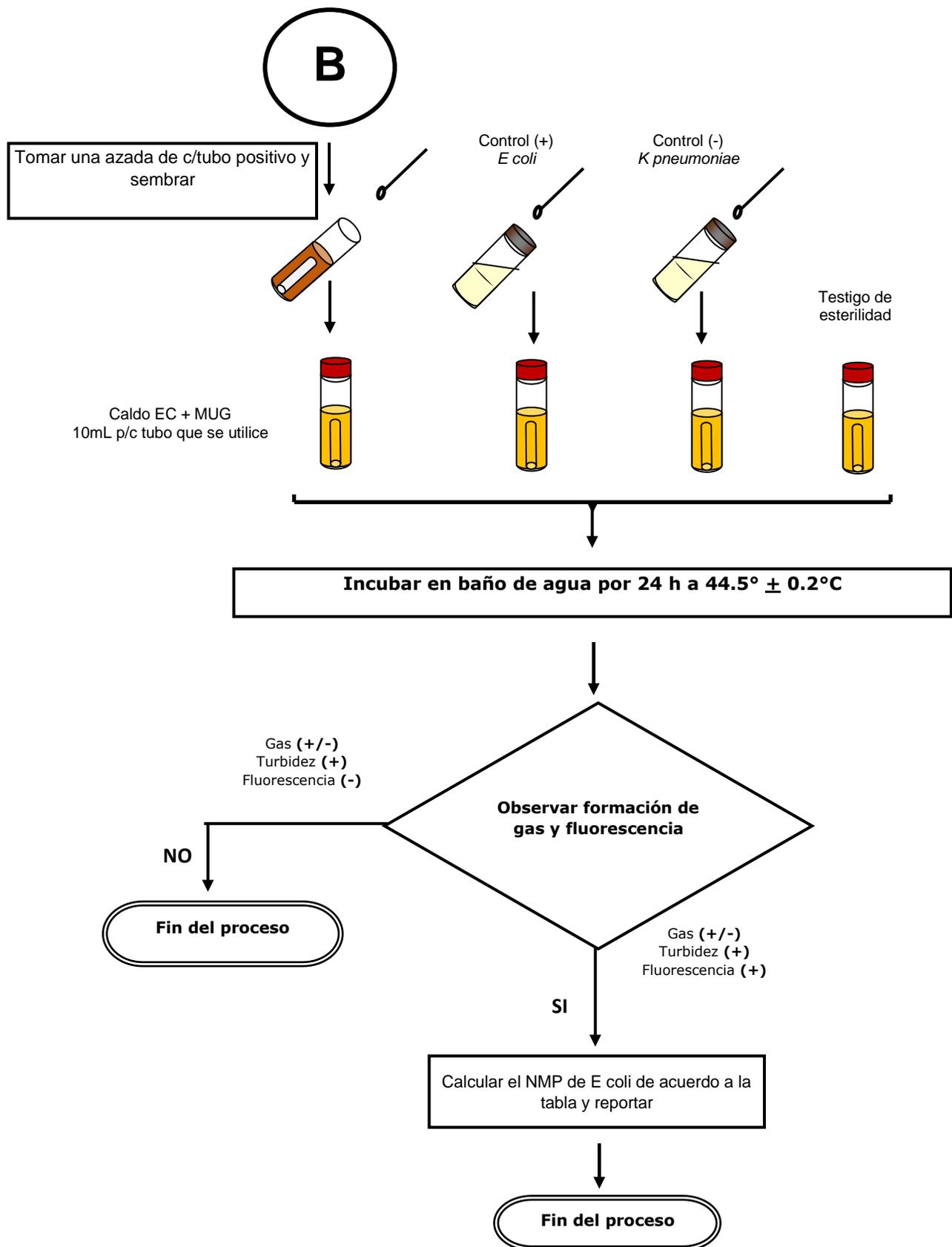


Figura 11
Diagrama de *E. coli* para aguas de uso y consumo humano

Fuente: *Elaboración propia, 2024*

Box 25

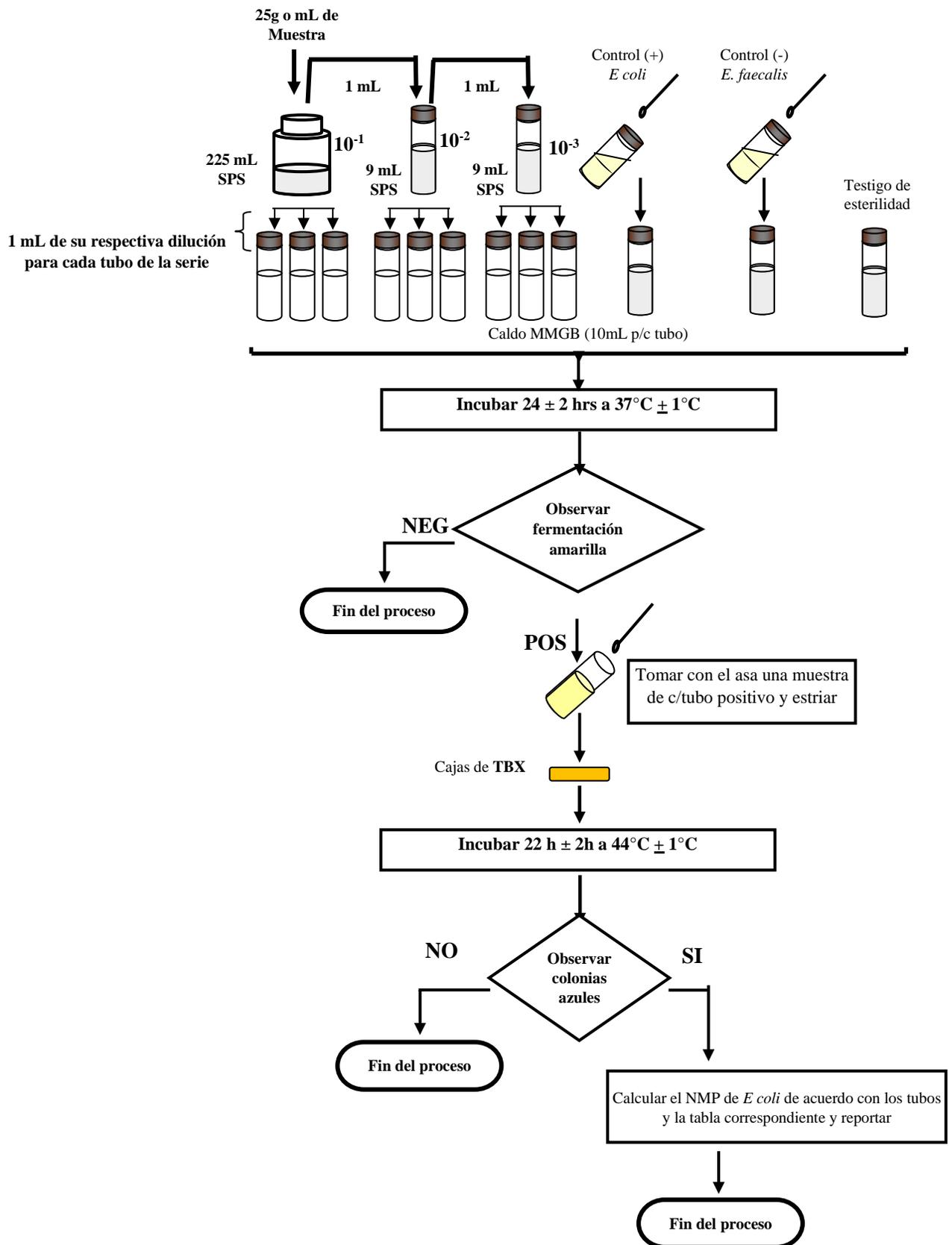


Figura 12

Diagrama de *E. coli* para productos de la pesca

Fuente: Elaboración propia, 2024

Método de prueba No. 3. Estimación de la cuenta de *Staphylococcus aureus*

1. Introducción

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

2. Objetivo

Determinar la cuenta de *Staphylococcus aureus* en alimentos.

3. Alcance

Este método permite hacer una estimación del contenido de *S. aureus* en los productos de consumo, se efectúa directamente en placas de medio de cultivo selectivo y diferencial, con la confirmación mediante las pruebas de coagulasa y termonucleasa como determinante y; pruebas auxiliares (tinción de Gram, catalasa, fermentación anaeróbica del manitol y glucosa) en caso necesario

4. Referencia normativa

NOM-210-SSA1-2014. Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Apéndice Normativo “B”: Método de referencia para la estimación de la cuenta de *S. aureus*”

5. Términos y definiciones

- Alimento: Cualquier sustancia o producto, sólido, semisólido o líquido, natural o transformado, que proporciona al organismo elementos para su nutrición.
- Baird Parker: es un medio moderadamente selectivo y de diferenciación para el aislamiento y recuento de *Staphylococcus aureus* en alimentos, muestras ambientales y clínicas.
- Cámara húmeda: Caja de Petri estéril con una gasa humedecida con agua en su interior
- Coagulasa: Enzima proteica capaz de transformar el fibrinógeno en fibrina, provocando la formación de un coágulo visible.
- Homogeneizar: Hacer que una cosa sea homogénea igualando o haciendo uniformes los elementos que la componen.
- Lácteos: El grupo incluye alimentos como la leche y sus derivados procesados (generalmente fermentados). Las plantas industriales que producen estos alimentos se caracterizan por la manipulación de un producto altamente perecedero, como la leche, que debe vigilarse y analizarse correctamente durante todos los pasos de la cadena de frío hasta su llegada al consumidor.1
- *Staphylococcus aureus*: conocido como estafilococo áureo o comúnmente estafilococo dorado, es una bacteria anaerobia facultativa, Gram positiva, productora de coagulasa, catalasa, inmóvil y no esporulada que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo, estimándose que una de cada tres personas se halla colonizadas, aunque no infectadas, por ella
- Termonucleasa: Enzima termoestable que degrada al ácido desoxirribonucleico hasta nucleótido.

6. Materiales, equipos e instrumentos

- Asas desechables o de platino de 1mm
- Balanza con capacidad adecuada y sensibilidad de 0.1g.
- Baño de agua con cubierta que mantenga una temperatura de 35°C ó 37°C \pm 1°C
- Bolsas estériles para Stomacher

- Cajas de Petri estériles desechables
- Contador de colonias
- Cubre bocas.
- Enfriador eléctrico de 2°C a 8 °C.
- Estufa bacteriológica
- Gasas
- Gradillas para tubos de ensaye de 13 x 100 mm y 16 x 150 mm
- Guantes desechables de látex.
- Homogeneizador peristáltico (Stomacher)
- Incubadora que mantenga una temperatura de 36°C ± 1°C.
- Licuadora de motor industrial
- Matraces de vidrio con tapa rosca con capacidad de 250mL
- Mechero Bunsen
- Microscopio
- Pipetas bacteriológicas de 5mL y 1mL graduadas en 0.1mL y protegidas con tapón de algodón.
- Pipetas Pasteur
- Pipetores
- Placa de calentamiento
- Portaobjetos
- Probeta graduada de 100mL
- Termómetros Calibrados: Líquido en vidrio de 20-50°C y de -5-20°C. con división de 0.5°C
- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm y 16 x 150mm
- Utensilios: Cuchillos, Tenedores, Cucharas, charolas chicas de aluminio, Pinzas y, hojas y mango de Bisturí
- Varillas de vidrio de 3.5 mm de diámetro aprox. y 20 cm de largo dobladas en ángulo recto.
- Vaso de Precipitado de 250 mL y 600mL
- Vasos de Licuadora

Nota: Todo el material que tenga contacto con las muestras se esterilizará en Horno durante 2 h a 170-175°C o 1 h a 180°C; o en autoclave durante 30 min a una temperatura de 121°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.

7. Reactivos

- Aceite Mineral
- Ácido Desoxirribonucleico Helicoidal de Timo de Ternera: Agar Azul de Toluidina-ADN
- Agar Baird Parker (BP): Medio Base de Baird Parker, Emulsión de yema de huevo (puede usarse comercialmente preparada) y Solución de Telurito de potasio.
- Agar Soya Trypticase (AST)
- Agua destilada estéril
- Agua Peptonada Amortiguada (APAm)
- Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI)
- Caldo Rojo de Fenol y Manitol al 0.5% (MAN)
- Caldo Rojo de Fenol con Glucosa al 0.5% (RFcG)
- Cloruro de calcio al 5%
- Kit de Tinción Gram
- Peróxido de Hidrógeno al 3%
- Plasma de conejo con EDTA
- Solución Salina 0.85%

Nota: Los reactivos y medios de cultivo, se preparan según el fabricante.

8. Fase Pre-analítica

8.4. Condiciones ambientales

La prueba se debe realizar a temperatura ambiental entre 18- 27°C y de 50-65% de humedad.

8.5. Preparación de la muestra

Verificar que el lugar de trabajo esté limpio.

Las muestras congeladas deben mantenerse en refrigeración (2°C-5°C) un máximo de 18h antes de su análisis, sin llegar a la descongelación.

Preparación general de los alimentos: Tomar diferentes porciones del alimento, transferir 25g o mL a frascos de dilución con 225mL de agua peptonada amortiguada, para preparar una dilución 1:10. Cuando no se disponga de 25g de muestra se deberá justificar y utilizar la cantidad necesaria de solución reguladora de fosfatos, para obtener una dilución 1:10. Homogeneizar por 1 min o 2 min en licuadora u homogeneizador peristáltico.

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

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

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

Procedimiento para moluscos, desconchados y congelados. Pesar el total de la muestra, máximo 200g (carne y licor) y adicionar igual cantidad de diluyente para obtener una dilución 1:2. Licuar por 2 min. Continuar como se indica en el método.

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

8.6. Preparación del material de trabajo.

Todos los reactivos y material para el proceso de las muestras este completo y debidamente identificado.

9. Fase analítica

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

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

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

Mantener las placas con las tapas hacia arriba hasta que el inóculo sea absorbido totalmente por el agar. Invertir las placas e incubar por 24h + 2h a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, marcar y realizar la lectura de las colonias sospechosas; re-incubar por 24h + 2h a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Realizar nuevamente la lectura en busca de nuevas colonias sospechosas (típicas y atípicas).

Colonias típicas: colonias negras o grises, circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1mm a 1.5mm a las 24h de incubación y 1.5 a 2.5mm después de 48h de incubación, rodeadas por una zona clara que puede ser parcialmente opaca. Después de 24h, en esa zona clara, se puede observar un halo opalescente en la periferia de las colonias.

Colonias atípicas: Son colonias de las mismas dimensiones de las colonias típicas, pueden ser negras, brillantes con o sin un pequeño borde blanco, la zona clara es muy pequeña o no visible, y el halo opalescente no está o es apenas visible. También son colonias atípicas las colonias grises sin zona clara, del mismo tamaño que las colonias típicas. Hay bacterias de géneros distintos al *Staphylococcus*, que pueden dar la morfología colonial típica o atípica, por lo que la observación microscópica usando una tinción de Gram puede ayudar en la distinción del género.

Aplicar el siguiente criterio para la selección de las diluciones de trabajo:

- a) Cuando la cuenta se encuentre entre 15 y 150 colonias sospechosas por placa en la primera dilución seleccionada se deberán seleccionar:

Por placa, 5 colonias para confirmar, las cuales pueden tener características típicas o atípicas.

- i. Cuando solo existan colonias típicas en la placa, seleccionar 5 colonias típicas.
- ii. Cuando solo existan colonias atípicas en la placa, seleccionar 5 colonias atípicas.
- iii. Cuando existan colonias típicas y atípicas en la placa, seleccionar 5 colonias en total que incluyan típicas y atípicas (ejemplo: 4 típicas y 1 atípica haciendo un total de 5 colonias sospechosas)

- b) Cuando existan placas en la primera dilución con menos de 15 colonias en esa placa, seleccionar:

5 colonias típicas o todas las existentes en la placa, lo que sea menor y 5 colonias atípicas o todas las existentes en la placa, lo que sea menor

- c) Cuando se siembren muestras directas, es decir (0.3mL, 0.3mL y 0.4mL), considerar las 3 placas como una sola dilución:

Si la cuenta es mayor que 15 UFC, seleccionar 5 colonias entre todas las placas, es decir:

- i. Cuando solo existan colonias típicas en la placa, seleccionar 5 colonias típicas.
- ii. Cuando solo existan colonias atípicas en la placa, seleccionar 5 colonias atípicas.
- iii. Cuando existan colonias típicas y atípicas en la placa, seleccionar 5 colonias en total que incluyan típicas y atípicas (ejemplo: 4 típicas y 1 atípica haciendo un total de 5 colonias sospechosas)

Si la cuenta de las 3 placas es menor que 15 UFC, seleccionar 5 colonias típicas o todas las existentes en la placa, lo que sea menor y 5 colonias atípicas o todas las existentes en la placa, lo que sea menor.

Pruebas confirmativas.

Prueba de coagulasa: sembrar cada colonia sospechosa seleccionada en tubos con 1.5mL de BHI y en tubos con AST. Utilizar simultáneamente un control positivo de *S. aureus* y un control negativo de *S. epidermidis*. Incubar a 35°C o $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en baño de agua, durante 20h a 24h. Mantener los cultivos en AST a no más de $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para pruebas posteriores. Agregar a 0.1mL del cultivo anterior a 0.3mL de plasma de conejo con EDTA (a menos que el fabricante indique otras cantidades). Incubar a 35°C o $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en baño de agua y observar periódicamente a intervalos de 1h durante las primeras 4h a 6h; si no hay formación de coágulo, observar hasta las 24h.

Considerar la prueba positiva cuando el coágulo se forma completamente y es firme al invertir el tubo. En otro caso se deberán realizar las pruebas auxiliares.

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

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

Pruebas auxiliares:

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

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

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

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

10. Fase Post- analítica

a) Desecho de residuos

Se desecharán de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

b) Lavado de material

Lavar el material utilizado en la determinación conforme al Procedimiento interno para el Aseguramiento de la Calidad de los Resultados Analíticos.

11. Cálculos

Los cálculos se realizarán de acuerdo a la siguiente formula, la cual calcula el número “a” de *S. aureus* confirmado por placa:

$$a = \frac{bc}{Ac} \times Cc + \frac{bnc}{Anc} \times Cnc$$

Donde:

- **Ac** es el número de colonias típicas seleccionadas a confirmar
- **Anc** es el número de colonias atípicas seleccionadas a confirmar
- **bc** es el número de colonias típicas confirmadas
- **bnc** es el número de colonias atípicas confirmadas
- **Cc** es el número de colonias típicas contadas en la placa
- **Cnc** es el número de colonias atípicas contadas en la placa

Reportar los resultados como el número de *S. aureus* por mL o g de producto.

Para las placas con menos de 300 colonias de las cuales existan menos de 150 colonias típicas y/o atípicas en dos diluciones consecutivas, calcular el número de *S. aureus* por placa como se indica anteriormente, y calcular el número “N” como una medida ponderada de las dos diluciones sucesivas, usando la siguiente ecuación:

$$N = \frac{\Sigma a}{V(n1 + 0.1 n2) d}$$

Donde:

- Σa es la suma de las cuentas encontradas en las placas
- V es el número de mL en cada placa
- $n1$ es el número de placas seleccionadas en la primera dilución
- $n2$ es el número de placas seleccionadas en la segunda dilución
- d es el factor de dilución seleccionado en la primera dilución

Estimación de las cuentas bajas. Si las dos placas de la muestra directa o de la primera dilución contienen menos de 15 colonias, reportar los resultados como sigue:

- a) Para los productos líquidos, estime el número de *S. aureus* por mililitro

$$Ne = \frac{\Sigma a}{V \times 2}$$

Donde:

- Ne es el número estimado de colonias confirmadas de *S. aureus*
- Σa es el número de colonias confirmadas en las 2 placas
- V es el volumen inoculado en las placas

- b) Para otros productos, estime el número de *S. aureus* por gramo

$$Ne = \frac{\Sigma a}{V \times 2 \times d}$$

Donde:

- Ne es el número estimado de colonias confirmadas de *S. aureus*
- Σa es el número de colonias confirmadas en las 2 placas
- V es el volumen inoculado en las placas
- d es el factor de dilución en la primera dilución

12. Interpretación de resultados

Box 26

Tabla 5

Interpretación bioquímica de *Staphylococcus*

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

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

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

Cuando las placas de la dilución más baja tengan menos de 15 colonias típicas y/o atípicas, se debe agregar la nota de “valor estimado” al reporte de los resultados. Si fue inoculado 1.0mL en 3 placas, tratar éstas como una sola y seguir los procedimientos de confirmación.

Cuando no se tenga crecimiento reportar como:

Box 27

Tabla 6

Reporte de resultados por inóculo

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

Fuente de consulta: [NOM-210-SSA1-2014](#)

13. Validez de la prueba

El método debe cumplirse con estricto apego para que la prueba tenga la validez., e incluir al menos dos bacterias como control, pudiendo ser: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (positivo) y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (negativo), que sean tomados de las cepas de referencia por cada lote de muestras procesadas.

14. Medidas de seguridad

- Usar bata de laboratorio, cubre bocas, guantes estériles.
- Verificar que el lugar de trabajo esté limpio.
- Revisar que los reactivos y materiales para el proceso de las muestras estén completos y debidamente identificados.
- Lavarse las manos antes y después del proceso.
- Al término de uso de las cepas de trabajo, se desecharán de a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental- Salud ambiental- Residuos peligrosos biológicos- infecciosos- Clasificación y especificaciones de manejo.
- Descontaminar el material después de su uso de acuerdo a los procedimientos correspondientes.

15. Medidas de control de calidad

- Verificar la funcionalidad del proceso analítico mediante cepas control las cuales deberán demostrar pureza y viabilidad de las mismas.
- En el control de esterilidad anotar observaciones sólo en caso de presentar algún crecimiento en el medio.
- Lectura y registro de temperaturas de incubación con termómetros calibrados y verificados.
- Todos los equipos e instrumentos deberán estar incluidos en un programa de calibración, mantenimiento preventivo y verificación, de acuerdo a las características del equipo.

16. Apéndice

Box 28

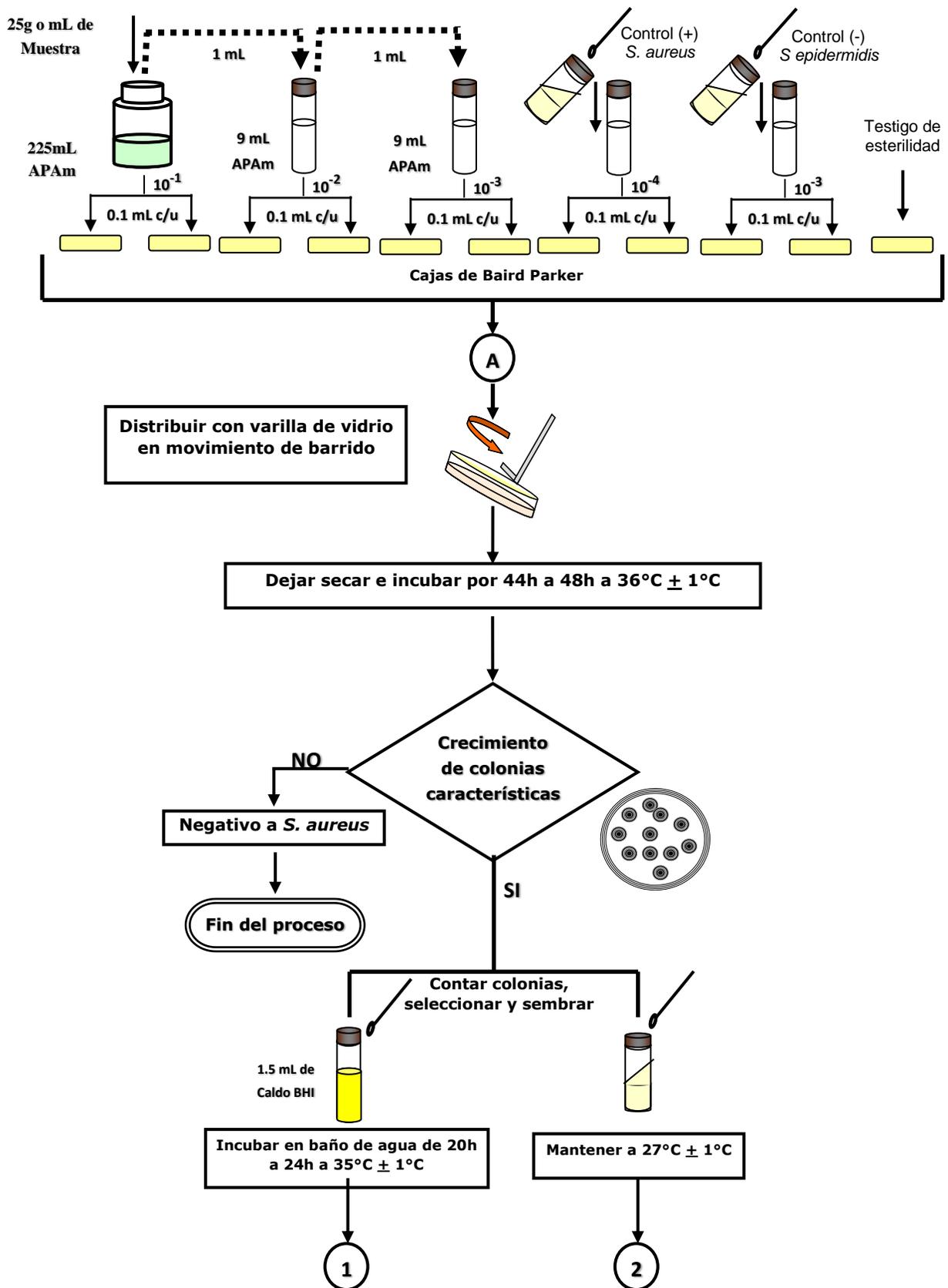


Figure 1

Diagrama para la estimación de la cuenta de *Staphylococcus aureus* en alimentos

Fuente: Elaboración propia, 2024

Box 29

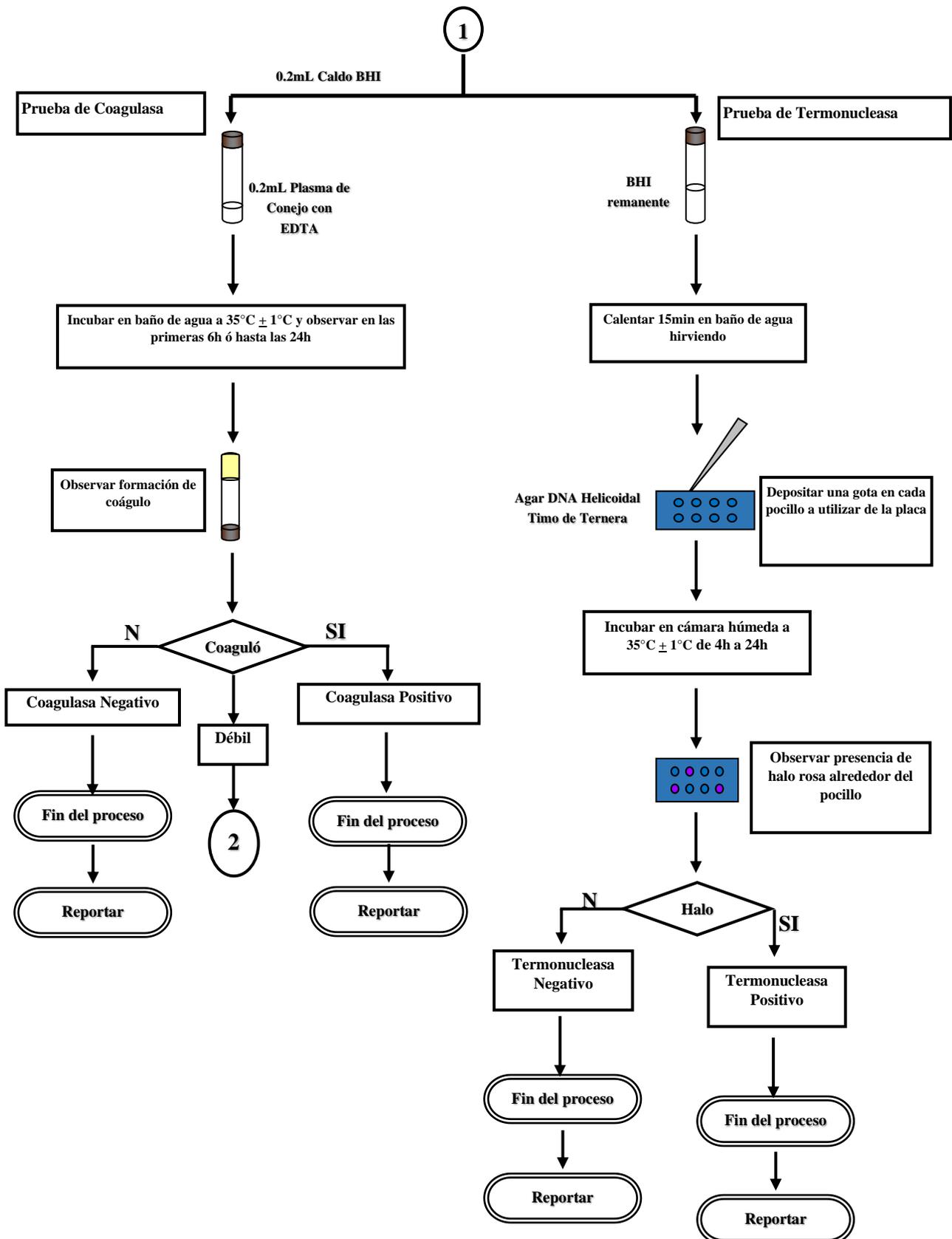


Figure 2

Diagrama para la estimación de la cuenta de *Staphylococcus aureus* en alimentos

Fuente: Elaboración propia, 2024

Box 30

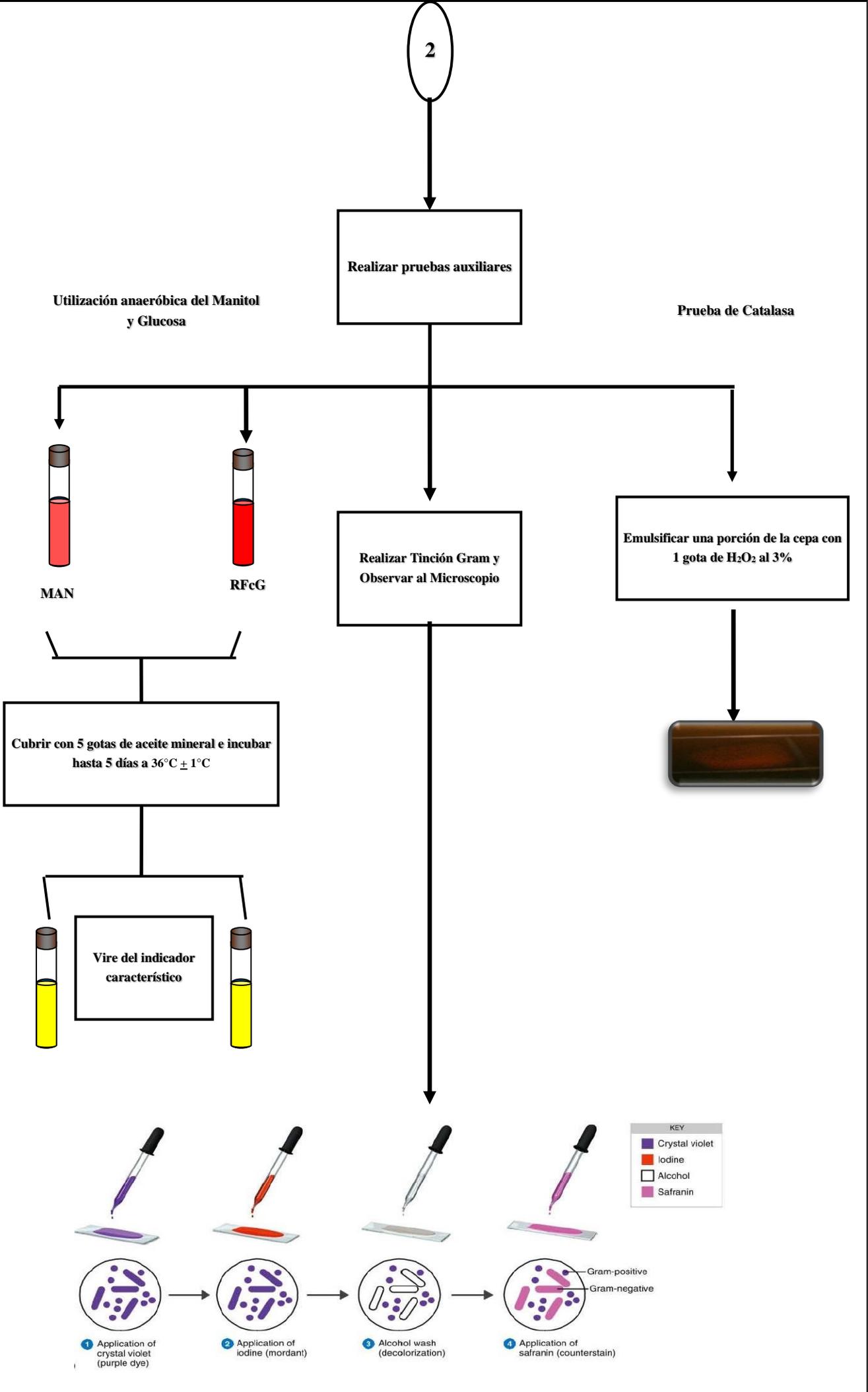


Figure 3
Diagrama para la estimación de la cuenta de *Staphylococcus aureus* en alimentos

Box 31

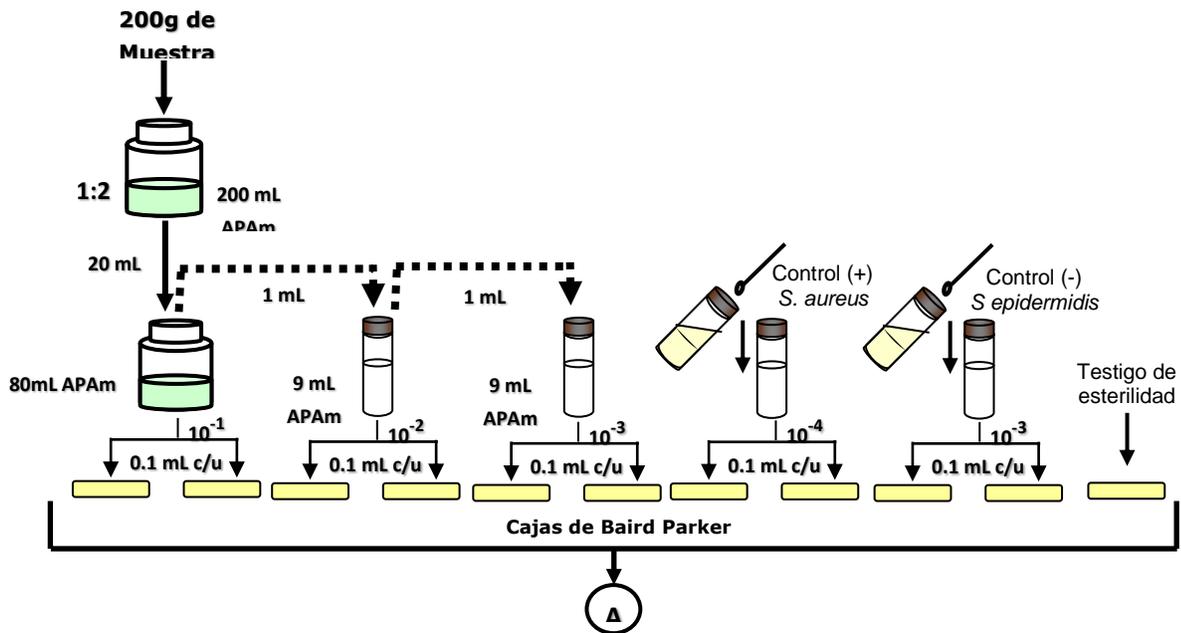


Figure 4

Diagrama para la estimación de la cuenta de *Staphylococcus aureus* en productos de la pesca y moluscos bivalvos

Fuente: *Elaboración propia, 2024*

Figura 9.3.

Box 32

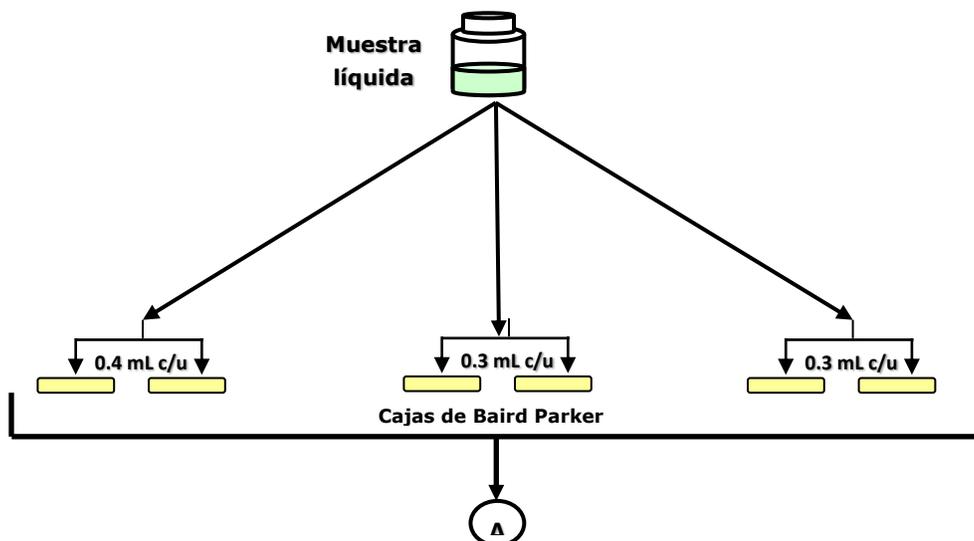


Figure 5

Diagrama para la estimación de la cuenta de *Staphylococcus aureus* en muestras directas

Fuente: *Elaboración propia, 2024*

Método de prueba No. 4. Determinación cualitativa de *Vibrio cholerae*.

1. Introducción

Debido a que generalmente la bacteria se busca en muestras con flora microbiana muy variada se requiere cultivarla primero en un medio de enriquecimiento, luego en un medio selectivo para eliminar al máximo la flora contaminante y confirmar con su identificación bioquímica y serológica.

2. Objetivo

Determinar la presencia o ausencia de *Vibrio cholerae* en aguas de consumo humano y alimentos crudos o cocidos.

3. Alcance

Para los alimentos de origen marino, crudos o cocidos; así mismo aplica para aguas de consumo humano y alimentos de derivados lácteos.

4. Referencia normativa

NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la Pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y Métodos de prueba.

NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

Se complementa con:

Manual de procedimiento para aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* 01. Publicación Técnica del InDRE #10. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Secretaría de Salud. México, DF; 1991.

Manual de técnicas y procedimientos para la investigación de *Vibrio cholerae* en agua y alimentos, Secretaría de Salud. Subsecretaría de Regulación y Fomento Sanitario. Laboratorio Nacional de Salud Pública. México, D.F. febrero de 1992.

5. Términos y definiciones

- Agua para uso y consumo humano (agua potable): Agua que no contiene contaminantes objetables, químicos o agentes infecciosos y que no causa efectos nocivos para la salud
- Crustáceos: Organismo acuático invertebrado cubierto por un caparazón o caparazón quitinoso; ejemplo, camarón.
- Homogeneizar: Hacer que una cosa sea homogénea igualando o haciendo uniformes los elementos que la componen.
- Método de Prueba: Procedimiento técnico utilizado para la determinación de parámetros o características de un producto, proceso o servicio.
- Molusco Bivalvo: Todas las especies de moluscos lamelibranquios que se alimentan por filtración, que cuentan con dos valvas; ejemplo, ostiones, mejillones o almejas.
- Producto a granel: Producto que debe pesarse, medirse o contarse en presencia del consumidor al momento de su venta
- Producto de la pesca: Cualquier producto para consumo humano, derivado en parte o en su totalidad de los recursos de la flora y fauna acuáticas, sean peces, crustáceos, moluscos o equinodermos.

- Producto de la pesca congelado: Peces, crustáceos, moluscos, equinodermos, u otros animales que han sido objeto de un proceso de disminución de temperatura lo suficientemente bajo para conservar la calidad sanitaria.
- Producto de la pesca fresco o refrigerado: Aquel que cumpliendo con las normas microbiológicas e higiénicas establecidas no ha sido sometido a proceso alguno de conservación, excepto la refrigeración mecánica o el enhielado
- *Vibrio cholerae:* bacteria Gram negativa, con forma de bastón curvo que provoca el cólera en humanos. En medio líquido es móvil por flagelos polares, anaerobio facultativo.

6. Materiales, equipos e instrumentos

- Aplicadores de madera
- Asas bacteriológicas desechables.
- Asas de platino o nicromel de 3 mm de diámetro
- Asas de platino o nicromel rectas
- Balanza analítica con sensibilidad de 0.1g
- Baño de agua de $42^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$
- Bolsas estériles para homogeneizador (stomacher)
- Cajas de petri estériles
- Cubre bocas.
- Enfriador Eléctrico
- Estufa incubadora
- Gasas
- Gradillas para tubos de ensaye de 16 x 150 mm y 13 x 100mm
- Guantes desechables de látex
- Homogeneizador peristáltico (Stomacher)
- Lámpara de aglutinación
- Licuadora industrial de 2 velocidades
- Mechero Bunsen
- Papel de pH (rango 1-14)
- Papel filtro
- Pipetas bacteriológicas de 10mL y 5mL graduadas en 0.1mL protegidas con tapón de algodón.
- Pipetores
- Portaobjetos
- Termómetros Calibrados: Líquido en vidrio de $20-50^{\circ}\text{C}$ y de $-5-20^{\circ}\text{C}$
- Tubos de ensaye de 16 x 150mm y 13 x 100mm
- Utensilios: Cuchillos, Tenedores, Cucharas, Bisturí y Pinzas
- Vasos de Licuadora

Nota: Todo el material que tenga contacto con las muestras se esterilizará en Horno durante 2 h a $170-175^{\circ}\text{C}$ o 1 h a 180°C ; o en autoclave durante 30 min a una temperatura de 121°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.

7. Reactivos

- Agua Peptonada Alcalina (APA) $\text{pH } 9 \pm 0.2$ de 450 mL 1X, 225 mL 1X y 50 mL 10X
- Agar Tiosulfato Citrato Sales Biliares Sacarosa (TCBS)
- Agar Triptona y Sal al 1% (T_1N_1)
- Agar Hierro y Triple azúcar (TSI) al 2% de NaCl
- Agar de Hierro y Lisina (LIA) al 2% de NaCl
- Agar Oxidación-Fermentación (O/F) al 2% de NaCl
- Antisueros Polivalentes para V. ch O1
- Antisueros Monovalentes para V. ch O1
- Base de Agar Sangre (BAB) al 2% de NaCl
- Caldo Arginina al 2% de NaCl
- Caldo Triptona (T_1N_0)
- Caldo Triptona y Sal al 3% (T_1N_3)
- Desoxicolato de Sodio al 0.5 %

- Hidróxido de Sodio (NaOH)
- Medio Movilidad Indol Ornitina (MIO) al 2% de NaCl
- Reactivo de Oxidasa
- Reactivo de Ehrlich o Kovacs
- Solución Salina Fisiológica estéril al 0.9%

Nota: Los reactivos y medios de cultivo, se preparan según el fabricante.

8. Fase Pre-analítica

8.1 Condiciones ambientales

La prueba se debe realizar a temperatura ambiental entre 18- 27°C y de 50-65% de humedad.

8.2 Preparación de la muestra

Verificar que el lugar de trabajo esté limpio.

Las muestras congeladas deben mantenerse en refrigeración (2-5°C) un máximo de 18 horas antes de su análisis, sin llegar a la descongelación.

Para muestras de moluscos bivalvos en general deben tomarse un mínimo de 10 a 12 moluscos bivalvos, a fin de obtener una muestra representativa o dependiendo de la especie se pueden utilizar de 20 a 30 piezas para obtener el peso adecuado hasta obtener un total de 200 g entre licor y carne.

Si llegasen a venir en concha, lavarse las manos con agua y jabón antes de comenzar. Enjuagar el exceso de suciedad de las conchas y cepillar con un cepillo estéril bajo el chorro de agua potable poniendo particular atención en las hendiduras de las conchas. Colocar las conchas limpias en toallas de papel absorbente o gasas limpias. Desechar los moluscos que tengan las conchas dañadas o con las valvas abiertas. Se puede usar guantes para evitar dañarse. Una vez secadas, con ayuda de un cuchillo desconchador estéril, insertar las puntas entre las valvas y hacer palanca para cortar el músculo abductor de las conchas y vaciar el molusco en un recipiente estéril.

8.3 Preparación del material de trabajo.

Todos los reactivos y material para el proceso de las muestras este completo y debidamente identificado.

9. Fase analítica

a) Para Alimentos:

Se basa en el análisis de 50g de la muestra analítica en una proporción de 1:9 de muestra/caldo. Esta cantidad puede variarse siempre que se mantenga la misma proporción. Se recomienda una muestra de 50 g o más.

Las muestras de moluscos bivalvos deberán analizarse en su composición básica de líquido y carne. Para moluscos bivalvos desconchar de 10 a 12 piezas grandes, incluir el líquido.

Homogeneizar una porción de 50 g de muestra en 450 mL de APA por 2 minutos a alta velocidad. Esto hace la dilución 1:10. Verter 250 mL (g) de la dilución 1:10 a un segundo recipiente estéril. Prepare dos series de diluciones de 1:100 y 1:1000. En este momento deberá tener dos series de tres diluciones.

Una serie se incuba de 35-37°C y la otra serie de 3 diluciones incubarla a 42°C. Las dos series se incuban durante un período de 6h y 18 h.

Después de cada uno de los períodos de incubación (6h y 18 h) y sin agitar, transferir el inóculo de la película (crecimiento superficial) con un asa de 3-5 mm de diámetro a una placa de agar TCBS. Incubar durante 18-24 h de 35-37°C.

Examinar las placas para determinar si se presentan las características coloniales para *Vibrio cholerae* (El Tor y Clásico): colonias grandes, lisas, amarillas (positivas para la fermentación de la sacarosa) y ligeramente achatadas, con el centro opaco y los bordes traslúcidos.

Seleccionar por lo menos 3 colonias sospechosas de cada placa y aplicarlas con estría cruzada para aislar en T1N1 e incubar durante 12-18 h a 35-37°C.

Después de la incubación se realiza la prueba de la oxidasa tomando una azada del cultivo en Agar T1N1 con asa de plástico o palillo de madera estéril y aplicarlo (según el tipo de reactivo de oxidasa) al papel filtro impregnado con el reactivo comercial. La reacción POSITIVA se observa por la producción de un color azul o morado en un tiempo no mayor de 20 seg.

Con la misma asada obtenida del cultivo de T1N1 se efectúa la prueba de hilo o string. Se coloca una gota de Desoxicolato de sodio al 0.5 % en una caja de Petri y friccionar suavemente el palillo con el cultivo, levantarlo y observar la formación de un hilo o cuerda lo que significa que la prueba es POSITIVA.

Cuando las pruebas de oxidasa e hilo (string) son POSITIVAS, continuar con la identificación bioquímica inoculando los siguientes medios:

- BAB (por estría en la superficie inclinada).
- TSI (por estría en la superficie inclinada y por punción en el fondo).
- LIA (por estría en la superficie inclinada y doble punción en el fondo).
- Medio MIO y O/F: se inoculará por punción. (Para el caso del O/F se utilizará por duplicado ya que a uno de los tubos se le agregarán 5gotas de aceite mineral para sellar la superficie del medio).
- Caldo Arginina: por inóculo (se le agregarán 5gotas de aceite mineral para sellar la superficie del medio).
- Caldo T₁N₃ y Caldo T₁N₀: para la prueba de la halofilia, inocular un tubo conteniendo el medio. [Verificar crecimiento observando desarrollo en el tubo. Para llevar a cabo la prueba de Indol: añadir 5 a 7 gotas del reactivo de Kovac al tubo del caldo (con ó sin crecimiento). El desarrollo de un color rojo intenso, constituye una prueba POSITIVA para Indol]

Todas se Incubarán de 18-24h a 35-37°C.

Las características bioquímicas de *Vibrio cholerae* 01 se pueden observar en el anexo.

Para el ensayo de los antígenos de *V. cholerae*, se colocarán 2 gotas por separado de solución salina al 0.9% sobre un portaobjetos y se suspenderá en cada una de las gotas, una porción del cultivo desarrollado en BAB. Se agregará a una de ellas una gota del antisuero polivalente y se mezclará con el canto del asa o empleando aplicadores de madera. Se agitará inclinando la lámina hacia atrás y hacia adelante durante aproximadamente 1 min. Posteriormente se observará bajo buena iluminación sobre un fondo oscuro considerando cualquier grado de aglutinación como positiva.

Si la prueba da POSITIVA, se procede a realizar el mismo paso, pero con los Antiseros Monovalentes INABA y OGAWA. Resultados positivos o negativos finalizan la prueba.

b) Para helados o bases o mezclas para helados y para los quesos:

Se deben preparar las siguientes diluciones 10-1, 10-2 10-3 ,10-4, 10-5 y 10-6. Tomar 25g de helado o bases o mezclas para helados o queso previamente molido e introducirlos en un vaso estéril de licuadora de 500 mL de capacidad que contenga 225 mL de APA y homogeneizar por 2 minutos a la máxima velocidad. Esta es la dilución 1:10. De ésta preparar diluciones 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 hasta 1:1000000 en 9 ó 90 mL de APA.

Incubar las seis diluciones entre 35-37 °C de 18-24 h.

Después de la incubación, y sin agitar, transferir el inóculo de la película (crecimiento superficial) con un asa de 3-5 mm de diámetro a una placa de agar TCBS. Incubar durante 18 a 24 h de 35-37°C.

Examinar las placas a fin de determinar si se presentan las características coloniales que a continuación se describe, seleccionar por lo menos 3 colonias sospechosas de cada placa y aplicarlas con estría cruzada para aislar en agar T1N1 e incubar durante 12-18 h a 35-37 °C.

Las colonias de *V. cholerae* (el Tor y Clásico) son grandes, lisas, amarillas, (positivas para la fermentación de la sacarosa) y ligeramente achatadas, con el centro opaco y los bordes traslucidos.

A partir de aquí se continúa como el procedimiento de los alimentos.

c) Para Agua de consumo humano:

Enriquecimiento doble en agua Peptonada: Se debe de recolectar mínimo 1 litro de agua en un recipiente estéril; la cual debe de contener dos cucharadas cafeteras llenas de NaCl. Después de recolectada la muestra, se debe ajustar su pH a 9.2 con NaOH 1N antes de ser transportada al laboratorio, en el caso de que las pruebas se atrasen en el laboratorio.

Se emplean frascos de 500 mL de boca ancha con tapa de rosca, que contenga 50mL de Agua Peptonada concentrada alcalina 10X (10% de peptona y 10% de NaCl) con pH de 9.0, al cual se le agrega 450 mL de muestra (agua blanca) para obtener una dilución 1:10.

La dilución 1:10 se incuba durante 6 h o toda la noche a 37°C.

Transcurrido el tiempo, con un hisopo se toma una muestra de la superficie del agua del frasco y se siembra una placa de medio selectivo (TCBS); éste mismo hisopo se coloca en un tubo de APA 1X (1% de peptona y 1% de NaCl) de 10 mL con pH de 9.0. Ambos se incuban a 37°C; la caja por un lapso de 18 a 24 h y el tubo durante 6 h.

A partir del crecimiento en tubo, se siembra otra placa de TCBS y se incuba de 18 a 24 h a 37°C para aislar colonias amarillas sospechosas. A partir de aquí se continúa como el procedimiento de los alimentos.

10. Fase Post- analítica

a) Desecho de residuos

Se desecharán de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

b) Lavado de material

Lavar el material utilizado en la determinación conforme al Procedimiento interno para el Aseguramiento de la Calidad de los Resultados Analíticos.

11. Cálculos

No Aplica.

12. Interpretación de resultados

A continuación, se muestran las reacciones bioquímicas características:

Box 33

BIOQUÍMICA	REACCIÓN CARACTERÍSTICA DE <i>Vibrio cholerae</i>
TSI	A / A ó K*/ A (amarillo/amarillo ó rojo/amarillo)
LIA	K/K ó K/N (morado/morado ó morado/inoloro)
MOVILIDAD	POSITIVO (crecimiento alrededor de la picadura)
INDOL	POSITIVO (halo rojo)
ORNITINA	POSITIVO (cualquier color diferente al amarillo)
OXIDACIÓN	POSITIVO (amarillo)
FERMENTACIÓN	POSITIVO (amarillo)
ARGININA	NEGATIVO (amarillo)
T ₁ N ₀	POSITIVO (turbidez)
T ₁ N ₃	POSITIVO (turbidez)
OXIDASA	POSITIVO (púrpura)
STRING	Positivo (hilo mucoso aperlado)

Autoría propia; 2024. Fuente de consulta: NOM-242-SSA1-2009.
*: Raramente A: ácido K: alcalino N: Neutro

Tabla 7Interpretación bioquímica de *Vibrio cholerae*.

- Si resultan negativas las pruebas de oxidasa y string reportar como V. ch O1 AUSENTE.
- Cuando la aglutinación a la serología es positiva reportar como V. ch O1 PRESENTE.
- Cuando la aglutinación es negativa pero bioquímicamente es característica, reportar como V. ch No O1.
- Los resultados de la investigación de V. ch O1 se reportan como AUSENTE o PRESENTE en 25 ó 50 g del mismo. En caso de haber realizado la aglutinación en algún suero monovalente, reportar en cuál de ellos fue: Inaba u Ogawa.

13. Validez de la prueba

El método debe cumplirse con estricto apego para que la prueba tenga la validez e incluir al menos dos bacterias como control, pudiendo ser: *Vibrio cholerae* O1 Ogawa LEM-04002 o *Vibrio cholerae* O1 Inaba LEM-04001 (positivo), *Vibrio Cholerae* No01 LEM-04003 (negativo), que sean tomados de las cepas de referencia por cada lote de muestras procesadas.

14. Medidas de seguridad

- Usar bata de laboratorio, cubre bocas, guantes estériles.
- Verificar que el lugar de trabajo esté limpio.
- Revisar que los reactivos y materiales para el proceso de las muestras estén completos y debidamente identificados.
- Lavarse las manos antes y después del proceso.
- Al término de uso de las cepas de trabajo, se desecharán de a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental- Salud ambiental- Residuos peligrosos biológicos- infecciosos- Clasificación y especificaciones de manejo.
- Descontaminar el material después de su uso de acuerdo a los procedimientos correspondientes.

15. Medidas de control de calidad

- Verificar la funcionalidad del proceso analítico mediante cepas control las cuales deberán demostrar pureza y viabilidad de las mismas.
- En el control de esterilidad anotar observaciones sólo en caso de presentar algún crecimiento en el medio.
- Lectura y registro de temperaturas de incubación con termómetros calibrados y verificados.
- Todos los equipos e instrumentos deberán estar incluidos en un programa de calibración, mantenimiento preventivo y verificación, de acuerdo a las características del equipo.

16. Apéndice

Box 34

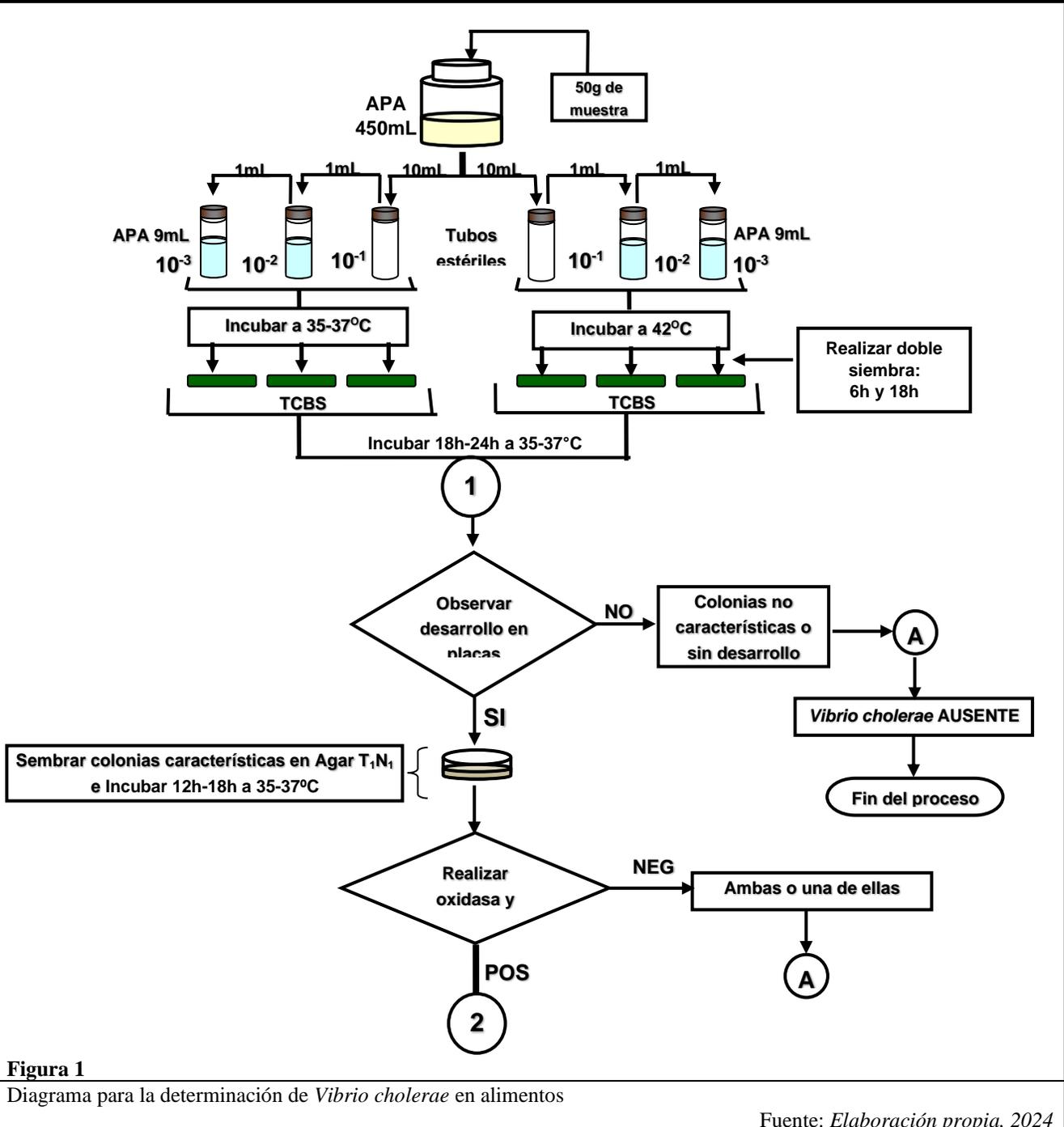


Figura 1

Diagrama para la determinación de *Vibrio cholerae* en alimentos

Fuente: *Elaboración propia, 2024*

Box 35

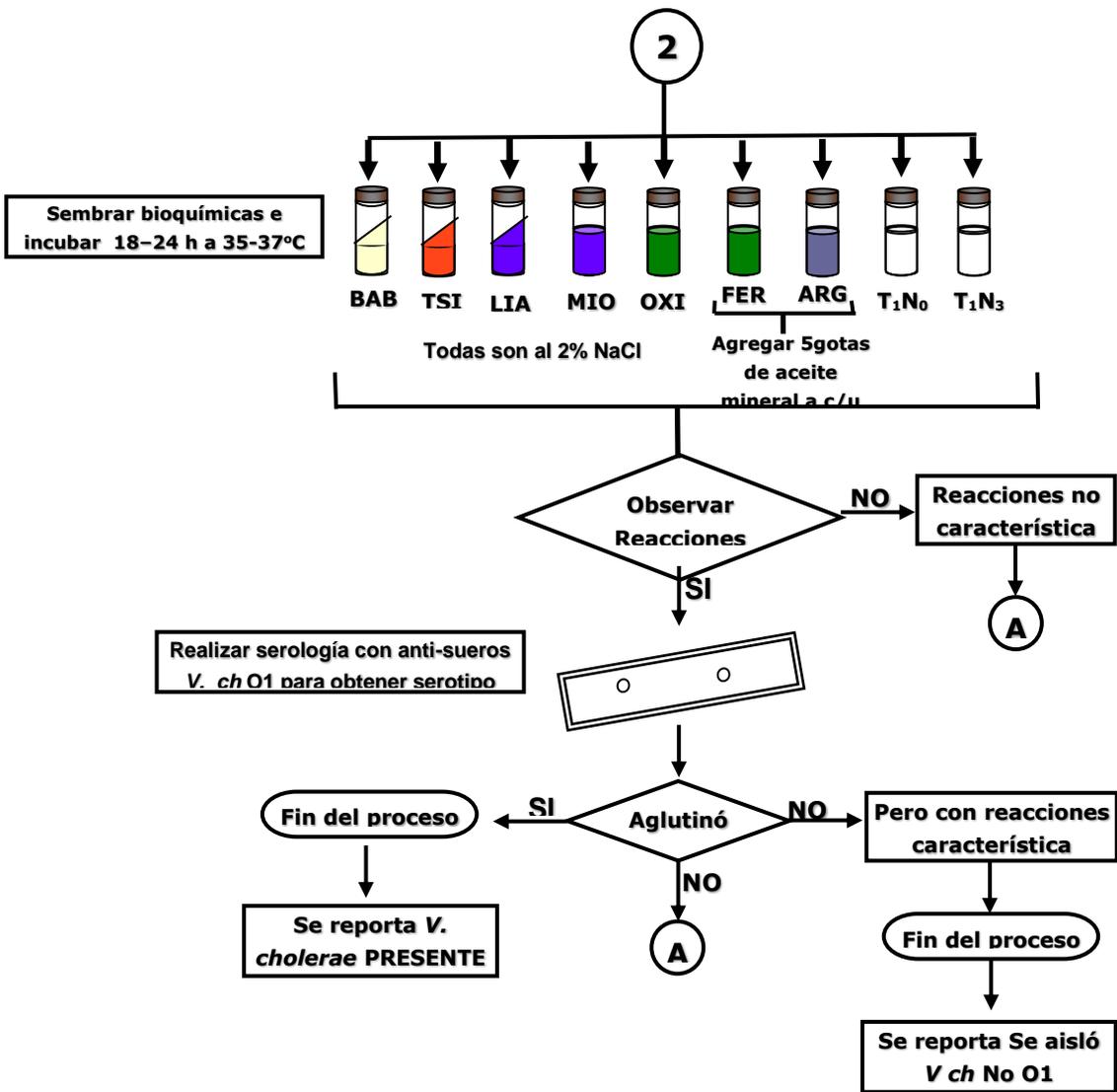


Figura 2
Diagrama para la determinación de *Vibrio cholerae* en alimentos

Fuente: Elaboración propia, 2024

Box 34

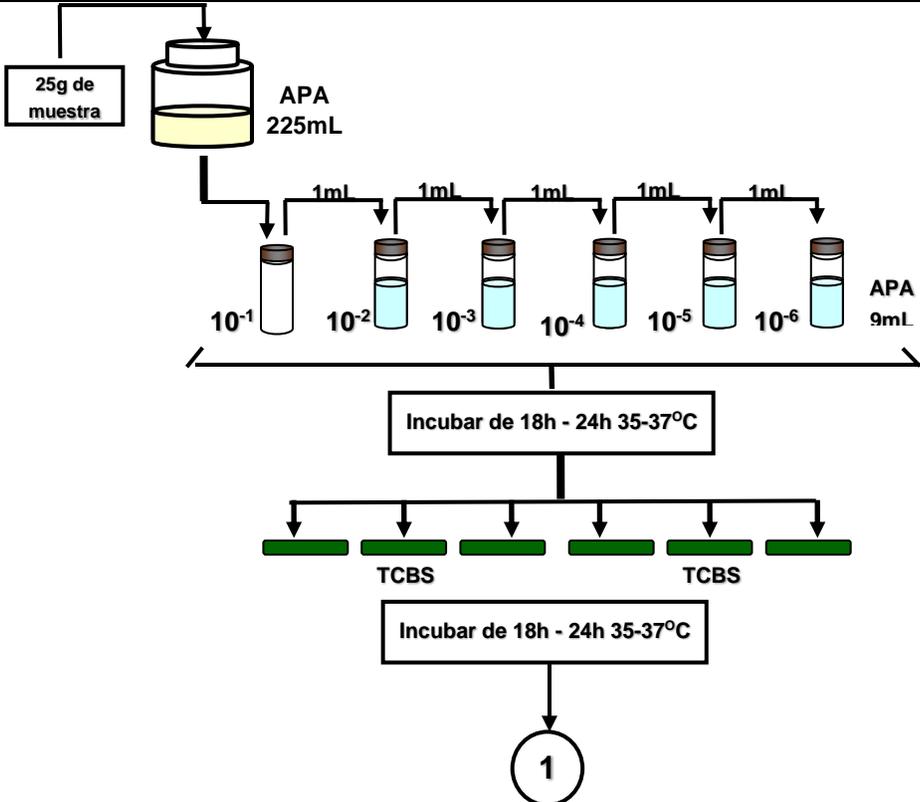


Figura 3
Diagrama para la determinación de *Vibrio cholerae* en helados, bases o mezclas para helados y quesos

Fuente: Elaboración propia, 2024

Box 34

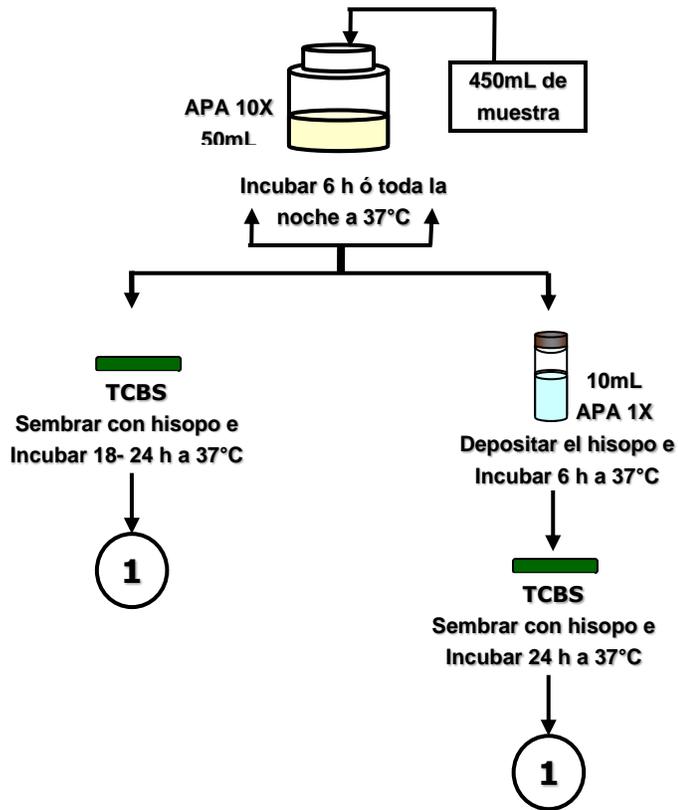


Figura 4

Diagrama para la determinación de *Vibrio cholerae* en agua de consumo humano

Fuente: *Elaboración propia, 2024*

Box 35

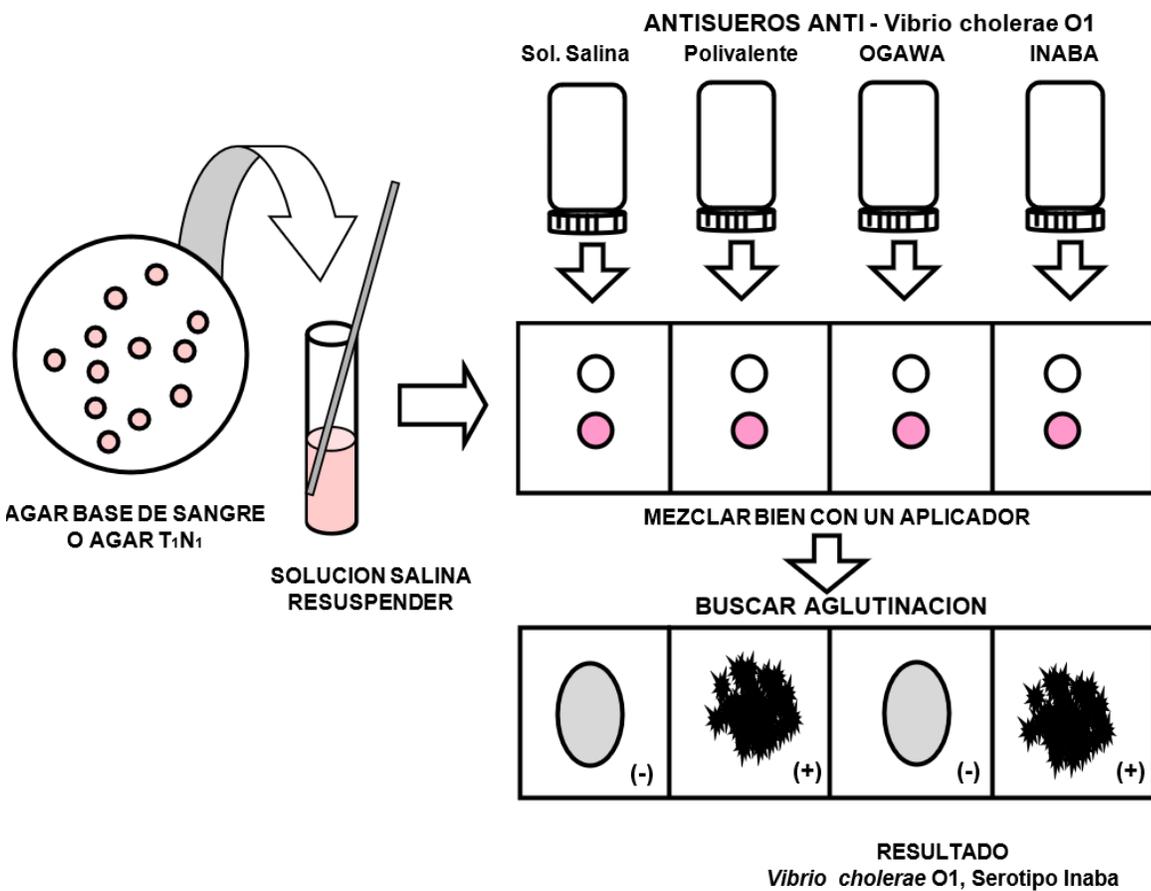


Figura 5

Prueba de Serotipificación

Fuente: *Elaboración propia, 2024*

Técnica:

- Colocar en un portaobjetos limpio libre de grasa 2 gotas de solución salina y una gota del antisuero a probar.
- Tomar una asada de la colonia a partir de Agar T₁N₁ o de BAB y hacer una suspensión con solución salina.
- Tomar una gota de esta suspensión y mezclar con la gota de antisuero correspondiente (polivalente o monovalente) y salina.
- Mover el portaobjeto para mezclar y observar la aglutinación.

Método de prueba No. 5. Determinación y estimación de la densidad de *Vibrio parahaemolyticus*

1. Introducción

Este método se basa estadísticamente en tres pasos: Primero; dilución de la muestra en tubos múltiples que contienen caldo de enriquecimiento, de tal manera que todos los tubos de la menor dilución sean positivos y todos los tubos de mayor dilución sean negativos [técnica del Número Más Probable (NMP)], donde un resultado positivo presuntivo se demuestra por turbidez en el tubo indicando el desarrollo microbiano; Segundo; el aislamiento en agar selectivo y diferencial que elimina al máximo la flora acompañante y, Tercero; la confirmación de la presencia del *V. Parahaemolyticus* por identificación bioquímica. Estas combinaciones de resultados positivos y negativos son consultadas en tablas estadísticas que estiman el número de microorganismos presentes en las muestras.

2. Objetivo

Determinar la densidad microbiana de *Vibrio parahaemolyticus* por la técnica del Número Más Probable (NMP).

3. Alcance

Aplicable para todos los alimentos de origen marino (crudos ó cocidos).

4. Referencia normativa

Bacteriological Analytical Manual (BAM). Chapter 9 Vibrio. Mayo, 2004.

NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la Pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y Métodos de prueba.

5. Términos y definiciones

- Crustáceos: Organismo acuático invertebrado cubierto por un caparazón o caparachón quitinoso; ejemplo, camarón.
- Homogeneizar: Hacer que una cosa sea homogénea igualando o haciendo uniformes los elementos que la componen.
- Molusco Bivalvo: Todas las especies de moluscos lamelibranquios que se alimentan por filtración, que cuentan con dos valvas; ejemplo, ostiones, mejillones o almejas.
- *Vibrio Parahaemolyticus*: Miembro del género *Vibrio*, bacilo Gram-negativo con forma de bastón curvo, en medio líquido es móvil por flagelos polares. Es uno de los principales causantes de diarrea bacteriana asociada con el consumo de mariscos. Organismo de estuario halófilo que se encuentra en aguas costeras de prácticamente todas las regiones templadas.

6. Materiales, equipos e instrumentos

- Aplicadores de madera
- Asas bacteriológicas de 3mm de diámetro
- Asas rectas de platino
- Balanza analítica con sensibilidad de 0.1g
- Bolsas estériles para homogeneizador (stomacher)
- Cubre bocas.
- Enfriador Eléctrico
- Estufa incubadora
- Gasas
- Gradillas para tubos de ensaye de 16 x 150 mm y 13 x 100mm
- Guantes desechables de látex
- Homogeneizador peristáltico (Stomacher)
- Licuadora industrial de 2 velocidades

- Mechero Bunsen
- Papel filtro
- Pipetas bacteriológicas de 10mL y 5mL graduadas en 0.1mL protegidas con tapón de algodón.
- Pipetores
- Termómetros Calibrados: Líquido en vidrio de 20-50°C y de -5-20°C
- Tubos de ensayo de 16 x 150mm y 13 x 100mm
- Utensilios: Cuchillos, Tenedores, Cucharas, Bisturí y Pinzas
- Vasos de Licuadora

Nota: Todo el material que tenga contacto con las muestras se esterilizará en Horno durante 2 h a 170-175°C o 1 h a 180°C; o en autoclave durante 30 min a una temperatura de 121°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.

7. Reactivos

- Agua Peptonada Alcalina (APA) pH 8.5 ± 0.2 de [1X] ó [2X]
- Agar Tiosulfato Citrato Sales Biliares Sacarosa (TCBS)
- Agar Triptona y Sal al 1% (T₁N₁)
- Agar Cromogénico para Vibrio (CHROMagar)
- Agar Inclinado Arginina Glucosa (AGI) al 2% de NaCl
- Agar Movilidad Indol Ornitina (MIO) al 2% de NaCl
- Base de Agar Sangre (BAB) al 2% de NaCl
- Caldo o Agar Urea al 2% de NaCl
- Caldo Rojo de Fenol con Lactosa o Sacarosa (RF) al 2% de NaCl con o sin campana
- Caldo Triptona (T₁N₀)
- Caldo Triptona y Sal al 3% (T₁N₃)
- Caldo Triptona y Sal al 6% (T₁N₆)
- Caldo Triptona y Sal al 8% (T₁N₈)
- Caldo Triptona y Sal al 10% (T₁N₁₀)
- Discos para prueba de ONPG (o-Nitrofenil-D-galactósido)
- Reactivo de Oxidasa
- Regulador Salina Fosfatos pH 7.4 (PBS)
- Solución Salina Fisiológica estéril al 0.85%

Nota: Los reactivos y medios de cultivo, se preparan según el fabricante.

8. Fase Pre-analítica

8.1 Condiciones ambientales

La prueba se debe realizar a temperatura ambiental entre 18- 27°C y de 50-65% de humedad.

8.2 Preparación de la muestra

Verificar que el lugar de trabajo esté limpio.

La preparación se efectuará de acuerdo a la naturaleza de la muestra:

- a) Pescados: seleccionar porciones de la superficie (piel), carne, agallas e intestino del animal para completar 50 g y colocarlos en un vaso de licuadora.
- b) Moluscos bivalvos: en caso de animales en concha, se debe tener un mínimo de 10 a 12 ostiones a fin de obtener una muestra representativa y permitir la selección de animales completos disponibles para su desconche, obteniéndose aproximadamente 100 g de licor y carne; descartar moluscos con valvas abiertas. Con moluscos pequeños usar más piezas hasta obtener el peso adecuado. Adicionar un volumen o peso equivalente de PBS. Homogeneizar por 90 segundos, esto constituye una dilución 1:2.

- c) Crustáceos: como el camarón, utilizar todo el cuerpo, que incluye branquias y el intestino (total de 50 g)
- d) Productos procesados, calentados, deshidratados y congelados: Pesar 50 g.

8.3 Preparación del material de trabajo.

Todos los reactivos y material para el proceso de las muestras este completo y debidamente identificado.

9. Fase analítica

Enriquecimiento

Para los casos (a) y (c) adicionar 450 mL de PBS como diluyente para obtener una dilución 1:10. Homogeneizar por 1 min a velocidad alta. Preparar diluciones 1:100, 1:1000 o mayores si es necesario con APA, usando como diluyente PBS. Ver Anexo 1.

Para el inciso (b), transferir 20 g del homogeneizado obtenido a 80 mL de PBS para tener una dilución 1:10, se recomienda pesar para evitar imprecisiones al transferir volúmenes de la dilución 1:2 debido a la presencia de burbujas de aire. Preparar diluciones decimales (1 mL de la dilución 1:10 a 9 mL de PBS o se puede usar de igual forma 10 mL de la dilución 1:10 en 90 mL de PBS para tener una dilución 1:100 y así sucesivamente). Ver Anexo 1.

Para el inciso (d), inocular 10 mL de la dilución 1:10 a 3 tubos con 10 mL de APA [2X], esto representa una porción de 1 g en cada tubo; de igual manera, inocular 1 mL de las diluciones 1:10, 1:100, 1:1000, etc., a 3 tubos con 10 mL de APA [1X].

Incubar para todos los casos de 18 a 24 horas a 35 ± 2 °C.

Nota: En los productos obtenidos del mismo origen, que se conozca mediante análisis previos que la densidad de *Vibrio spp* es alta o son crudos como pescados, moluscos bivalvos, etc.; comenzar con 0.1 g en la primera serie de 3 tubos.

Aislamiento

Sembrar por estría cruzada en agar TCBS, todos los tubos de APA que presenten crecimiento (turbidez) en las 3 diluciones, tomando con un asa de 3 mm de diámetro a 1 cm de profundidad por debajo del nivel medio. Incubar a 35 ± 2 °C 24 horas.

Las colonias de *V. parahaemolyticus* son redondas, opacas, verdes o azuladas de 2 a 3 mm de diámetro.

Pruebas tamiz

A partir del Agar TCBS, inocular 2 o más colonias características de *V. parahaemolyticus* en Agar T1N1 e Incubar 12-18 hrs a 35 ± 2 °C. Posteriormente realizar la prueba de oxidasa que consiste en transferir una pequeña cantidad del cultivo a un segmento de papel filtro impregnado con el reactivo. La formación de un color púrpura dentro de 10 segundos indica que el ensayo es positivo. Utilizar aplicador de madera. Si la prueba resultó positiva sembrar en bioquímicas.

Pruebas bioquímicas:

- **BAB:** Sembrar por estría en la superficie. Este medio solo es para conservación de la cepa.
- **AGI:** Inocular por picadura y estría.
- **MIO:** Inocular por picadura a una profundidad de aproximadamente 5 cm. Un crecimiento alrededor de la picadura constituye una prueba positiva.

- Urea: Si es caldo, depositar un inóculo denso; si es agar, se siembra por estría. La prueba de ureasa es para diferenciar las cepas potencialmente patogénicas ya que la producción de ureasa está correlacionada con la presencia de los genes TDH y/o TRH. La producción de ureasa se determina con una coloración rosa (alcalina) en el medio. Los cultivos negativos deben incubarse 24 horas mas ya que hay cepas raras que producen ureasa lentamente.
- RF con Lactosa o Sacarosa: Depositar un inóculo denso en el caldo

Las anteriores bioquímicas deben de contener NaCl al 2%

- Caldos Triptona (T1N0, T1N3, T1N6, T1N8, y T1N10): Depositar un inoculo denso en los caldos a concentraciones de NaCl de 0%, 3%, 6% 8% y 10% para la prueba de la halofilia. La producción de turbidez en el caldo se lee como positivo.

Incubar todas las bioquímicas de 18-24 horas a 35 ± 2 °C

Confirmación de cepas positivas:

Del Agar T1N1 de las cepas positivas sembrar en cajas de CHROMagar, incubar a 35 ± 2 °C 24 h. Las colonias de *V. Parahaemolyticus* son de color malva o moradas.

Nota: en casos de brote o contingencias, se siembra desde la fase de aislamiento.

Al mismo tiempo realizar la prueba de ONPG, que consiste en el Método de Discos Impregnados: A partir de los cultivos en T1N1, hacer una suspensión densa del cultivo en un tubo estéril de 13x100 mm que contenga 0.1 mL de solución salina fisiológica estéril al 0.85%, añadir el disco impregnado con el reactivo y agitar suavemente. Incubar 18-24 horas a 35 ± 2 °C.

10. Fase Post- analítica

a) Desecho de residuos

Se desecharán de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

b) Lavado de material

Lavar el material utilizado en la determinación conforme al Procedimiento interno para el Aseguramiento de la Calidad de los Resultados Analíticos.

11. Cálculos

Cuando las colonias se identifican finalmente por bioquímicas como *V. Parahaemolyticus*, estimar la densidad bacteriana por el NMP, aplicar la Tabla de NMP con 95% de límite de confianza de 3 tubos. Considerar la dilución cuando proceda.

El intervalo del 95% de confianza se interpreta como sigue: si el analista supone que el número real de microorganismos cae dentro de los límites, entonces se asume que será correcto el 95% de las veces. El valor del NMP tabulado representa un intervalo y no un valor absoluto.

12. Interpretación de resultados

En la siguiente tabla se describen las reacciones bioquímicas características:

Box 36

BIOQUÍMICA	REACCIÓN CARACTERÍSTICA DE <i>Vibrio Parahaemolyticus</i>
ARGININA GLUCOSA INCLINADO	VARIABLE: K/A (púrpura/amarilla) ó A/A (amarillo/amarillo) sin gas , sin ácido
MIO	POSITIVO (crecimiento alrededor de la picadura)
UREA	VARIABLE: con crecimiento sin cambio de color (-) ó fucsia (+)
CALDO ROJO DE FENOL	NEGATIVO (color rosa)
T ₁ N ₀	SIN TURBIDEZ
T ₁ N ₃	TURBIDEZ
T ₁ N ₆	TURBIDEZ
T ₁ N ₈	TURBIDEZ
T ₁ N ₁₀	SIN TURBIDEZ
ONPG	NEGATIVO (incoloro)
OXIDASA	POSITIVA (púrpura)

Tabla 8Interpretación bioquímica de *Vibrio parahamolyticus*Fuente: *BAM 9*.

Si los resultados de las diferentes pruebas fueran negativos se reporta: < 3,0 NMP/g

Si los resultados de la investigación resultaran positivos se reporta primero presuntivamente como:

V. Parahaemolyticus _____NMP/g presuntivo.

Al obtener la lectura confirmatoria de la presencia del gen toxigénico, reportar como:

V. Parahaemolyticus _____NMP/g toxigénico.

13. Validez de la prueba

El método debe cumplirse con estricto apego para que la prueba tenga la validez., e incluir al menos dos bacterias como control, pudiendo ser: *Vibrio parahaemolyticus* ATCC-17802, *Vibrio Cholerae* No01 LEM-04003, que sean tomados de las cepas de referencia por cada lote de muestras procesadas.

14. Medidas de seguridad

- Usar bata de laboratorio, cubre bocas, guantes estériles.
- Verificar que el lugar de trabajo esté limpio.
- Revisar que los reactivos y materiales para el proceso de las muestras estén completos y debidamente identificados.
- Lavarse las manos antes y después del proceso.
- Al término de uso de las cepas de trabajo, se desecharán de a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental- Salud ambiental- Residuos peligrosos biológicos- infecciosos- Clasificación y especificaciones de manejo.
- Descontaminar el material después de su uso de acuerdo a los procedimientos correspondientes.

15. Medidas de control de calidad

- Verificar la funcionalidad del proceso analítico mediante cepas control las cuales deberán demostrar pureza y viabilidad de las mismas.
- En el control de esterilidad anotar observaciones sólo en caso de presentar algún crecimiento en el medio.
- Lectura y registro de temperaturas de incubación con termómetros calibrados y verificados.
- Todos los equipos e instrumentos deberán estar incluidos en un programa de calibración, mantenimiento preventivo y verificación, de acuerdo a las características del equipo.

16. Apéndice

Box 37

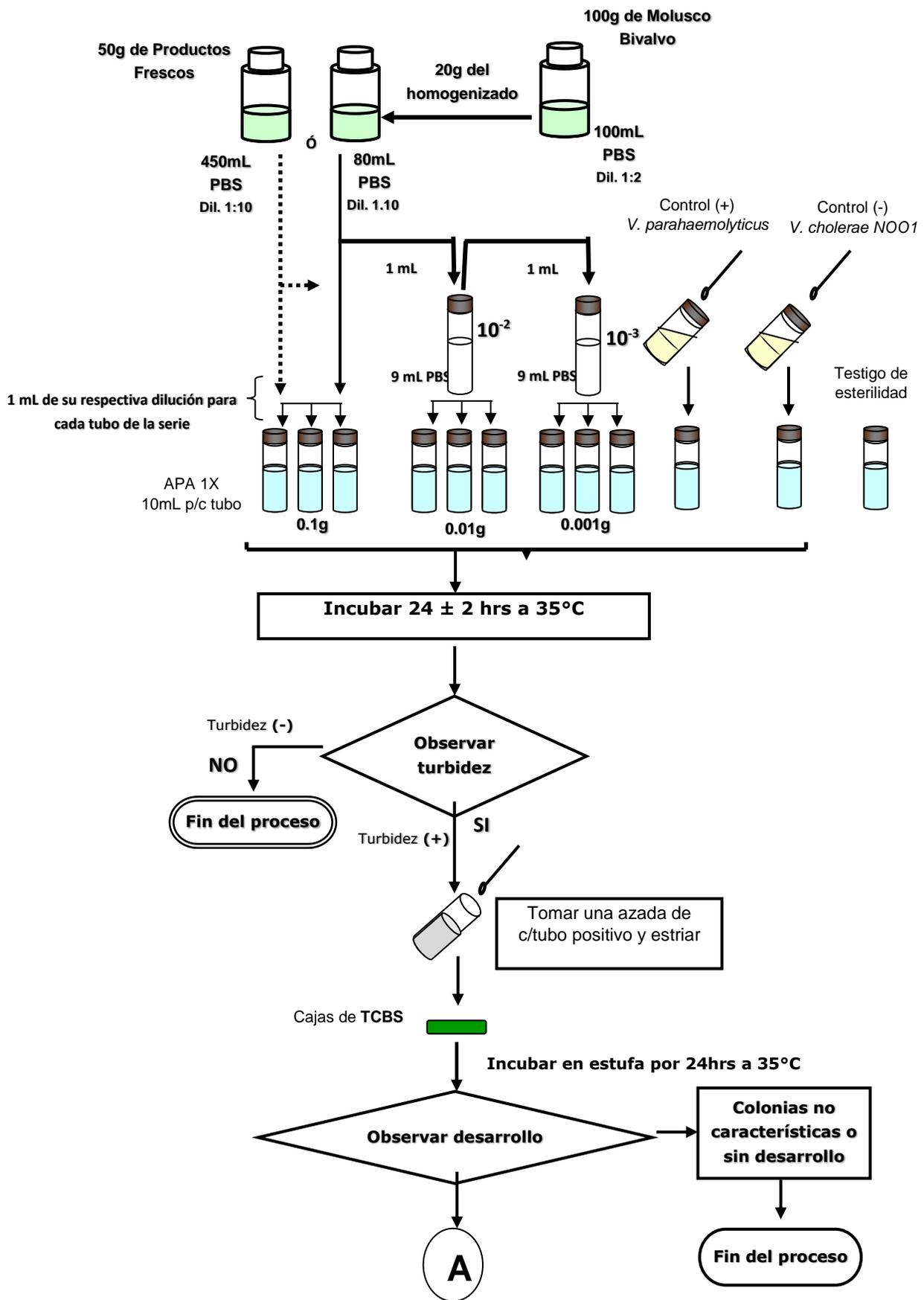


Figure 1
Diagrama para la determinación de *Vibrio parahaemolyticus*

Fuente: Elaboración propia

Box 38

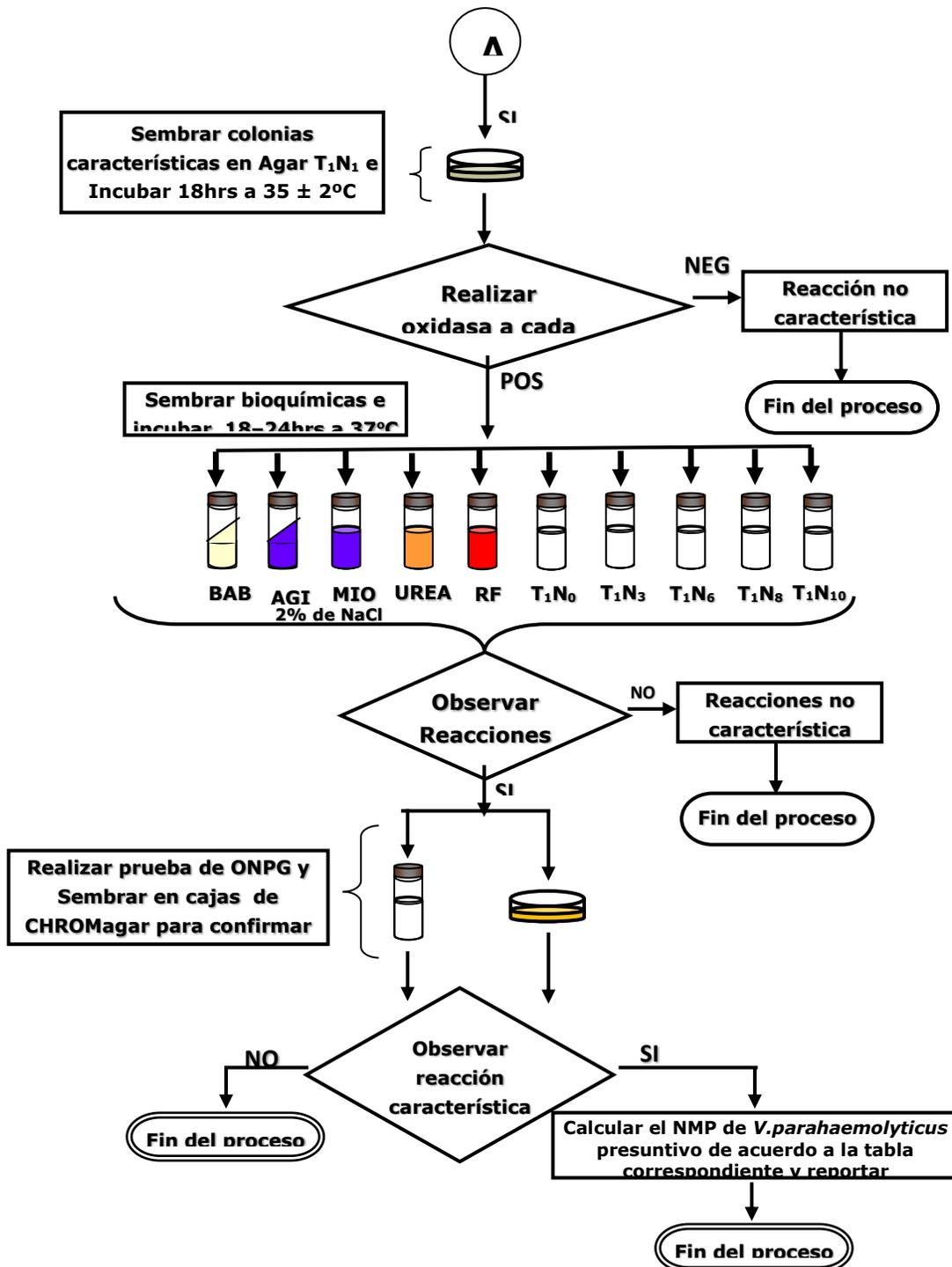


Figure 3
Diagrama para la determinación de *Vibrio parahaemolyticus*

Fuente: *Elaboración propia, 2024*

Referencias sugeridas

Djekić, I., Velebit, B., Pavlić, B. et al. Calidad de los alimentos 4.0: fabricación sostenible de alimentos para el siglo XXI. *Food Eng Rev* 15 , 577–608 (2023). <https://doi.org/10.1007/s12393-023-09354-2>

Foddai, ACG, Grant, IR Métodos para la detección de patógenos viables transmitidos por alimentos: estado actual de la técnica y perspectivas futuras. *Appl Microbiol Biotechnol* 104 , 4281–4288 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10542-x>

NMX-EC-17025-IMNC-2018. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración

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

Zhang, J.; Yang, H.; Li, J.; Hu, J.; Lin, G.; Tan, BK; Lin, S. Perspectivas actuales sobre bacterias patógenas transmitidas por alimentos viables pero no cultivables: una revisión. *Foods* 2023 , 12 , 1179. <https://doi.org/10.3390/foods12061179>

Declaraciones**Conflicto de intereses**

El presente trabajo no tiene ningún conflicto de interés que pudiera influir en el curso del proyecto y la presentación de resultados.

Contribución de los autores

Mariana Trinidad Santos Cervera & Carlos Armando Chan Keb: Idea de proyecto, metodología, recolección de datos y redacción del E-Book.

Aldo Alberto Chuc Sánchez: Recolección de datos y redacción del artículo.

Judith Ruiz Hernández: Recolección de datos y redacción del artículo.

Disponibilidad de datos y materiales

No se revisaron bases de datos, sino que la información empírica se recuperó in situ, en los espacios cotidianos de las y los estudiantes como los sitios web de las Normas Oficiales Mexicanas.

Financiación

La investigación no contó con financiamiento de ninguna clase.

Agradecimientos

Agradecemos a la Universidad Autónoma de Campeche por su disposición para la investigación, así como a los y las estudiantes que participaron en este Manual.

Instructions for Scientific, Technological and Innovation Publication

[Título en TNRoman y negrita No. 14 en inglés y español]

Apellido, Nombre 1^{er} Autor*^a, Apellido, Nombre 1^{er} Coautor^b, Apellido, Nombre 2^{do} Coautor y Apellido, Nombre 3^{er} Coautor^d [No.12 TNRoman]

^a  [Institución de afiliación](#),  [Researcher ID](#),  [ORCID ID](#), [SNI-CONAHCYT ID](#) o CVU PNPC [No.10 TNRoman]

^b  [Institución de afiliación](#),  [Researcher ID](#),  [ORCID ID](#), [SNI-CONAHCYT ID](#) o CVU PNPC [No.10 TNRoman]

^c  [Institución de afiliación](#),  [Researcher ID](#),  [ORCID ID](#), [SNI-CONAHCYT ID](#) o CVU PNPC [No.10 TNRoman]

^d  [Institución de afiliación](#),  [Researcher ID](#),  [ORCID ID](#), [SNI-CONAHCYT ID](#) o CVU PNPC [No.10 TNRoman]

Todos los perfiles ROR-Clarivate-ORCID y CONAHCYT deben estar hipervinculados a su sitio web

Prot-  [University of South Australia](#) •  [7038-2013](#) •  [0000-0001-6442-4409](#) •  416112

Clasificación CONAHCYT: https://marvid.org/research_areas.php [No.10 TNRoman]

Área:

Campo:

Disciplina:

Subdisciplina:

DOI: <https://doi.org/>



Claves del libro:

Explique los siguientes aspectos:

- ¿Cuáles son los principales aportes a la generación de Ciencia y Tecnología escritos en esta investigación?
 - ¿Cuáles son los aspectos claves a comprender para aplicar a la generación de conocimiento universal?
 - Escriba las principales conclusiones de la investigación.
 - ¿Cuántos autores cuentan con becas del CONAHCYT? ¿Cuántos autores tienen beca PRODEP y cuántos son de fuentes externas?
 - ¿Cuántas citas generaron los autores del trabajo en el último año?
 - ¿De qué instituciones provienen?
- Instituciones Públicas Estatales
Instituciones Públicas Estatales con Apoyo Solidario
Universidades Tecnológicas y Politécnicas
Universidades Interculturales
Instituciones Privadas
- ¿Cuáles son las palabras clave más utilizadas?

Citación: Apellidos, Nombre 1^{er} Autor, Apellidos, Nombre 1^{er} Coautor, Apellidos, Nombre 2^{do} Coautor y Apellidos, Nombre 3^{er} Coautor. Año de publicación. Título del libro. [Páginas.] ECORFAN.

Correo electrónico de contacto:

* ✉ [ejemplo@ejemplo.org]

URL de la estantería: <https://www.ecorfan.org/books.php>



ISBN XXX-XX-XXXXX-XX-X/© 2009 El Autor[es]. Publicado por ECORFAN-México, S.C. para su Holding X en nombre del Libro X. Este es un libro de acceso abierto bajo la licencia CC BY-NC-ND [<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>]

Revisión por pares bajo la responsabilidad del Comité Científico [MARVID](#)[®] en la contribución al Proceso de Revisión por Pares científico, tecnológico y de innovación mediante la formación de Recursos Humanos para la continuidad en el Análisis Crítico de la Investigación Internacional.



Instructions for Scientific, Technological and Innovation Publication

Resumen [En inglés]

Debe contener hasta 150 palabras

Resumen gráfico [En inglés]

El título va aquí		
Objetivos	Metodología	Contribución

Los autores deben proporcionar una imagen original que represente claramente el trabajo descrito en el libro. Los resúmenes gráficos deben presentarse en un archivo aparte. Tenga en cuenta que, al igual que cada artículo, debe ser único. Tipo de archivo: los tipos de archivo son archivos de MS Office. No debe incluirse ningún texto adicional, esquema o sinopsis. Cualquier texto o pie de foto debe formar parte del archivo de imagen. No utilice espacios en blanco innecesarios ni un encabezado de "resumen gráfico" dentro del archivo de imagen.

Palabras clave [En inglés]

Indique 3 palabras clave en TN Roman y negrita No. 12

Resumen [En español]

Debe contener hasta 150 palabras

Resumen gráfico [En español]

El título va aquí		
Objetivos	Metodología	Contribución

Instructions for Scientific, Technological and Innovation Publication

Los autores deben proporcionar una imagen original que represente claramente el trabajo descrito en el libro. Los resúmenes gráficos deben presentarse en un archivo aparte. Tenga en cuenta que, al igual que cada artículo, debe ser único. Tipo de archivo: los tipos de archivo son archivos de MS Office. No debe incluirse ningún texto adicional, esquema o sinopsis. Cualquier texto o pie de foto debe formar parte del archivo de imagen. No utilice espacios en blanco innecesarios ni un encabezado de "resumen gráfico" dentro del archivo de imagen.

Palabras clave [En español]

Indique 3 palabras clave en TN Roman y negrita No. 12

Introducción

Texto en TN Roman No.12, a espacio sencillo.

Explicación general del tema y explicar por qué es importante.

¿Cuál es su valor añadido con respecto a otras técnicas?

Enfoque claramente cada una de sus características

Explicar claramente el problema a resolver y la hipótesis central.

Explicación de las secciones del libro.

Desarrollo de los epígrafes y subepígrafes del libro con los números subsiguientes

Productos en desarrollo No.12 TN Roman, interlineado sencillo.

Inclusión de figuras y tablas-Editable

En el contenido del Libro cualquier figura y tabla deben ser formatos editables que puedan cambiar de tamaño, tipo y número de letras, a efectos de edición, estas deben ser de alta calidad, no pixeladas y deben ser apreciables incluso reduciendo la escala de la imagen.

[Indicando el título en la parte superior con el No.12 y TN Roman en Negrita].

Box

Table 1

Título [No deben ser imágenes: todo debe ser editable]

Fuente [en cursiva]

Box

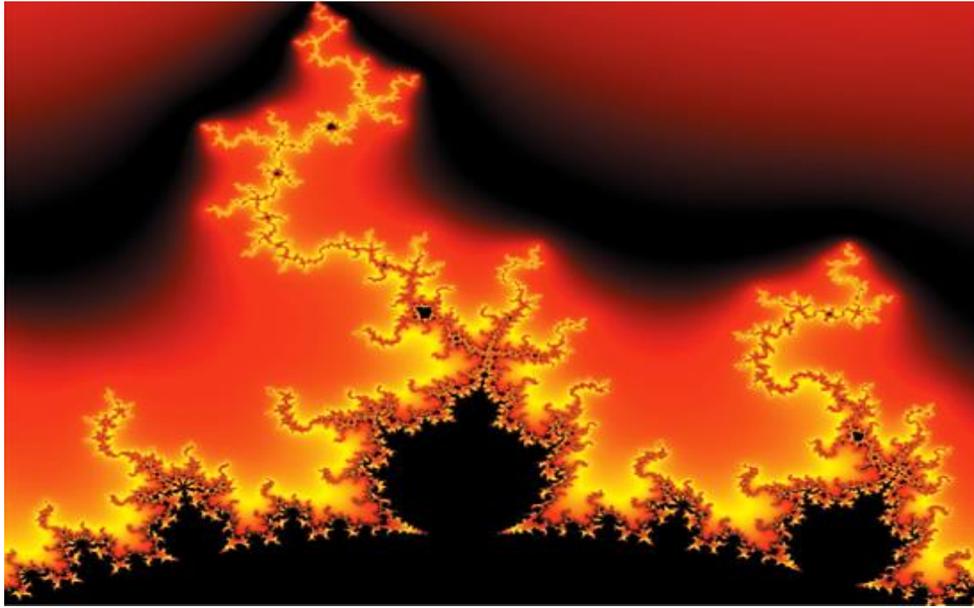


Figura 1

Título [No deben ser imágenes: todo debe ser editable]

Fuente [en cursiva]

El máximo de Box son 10 elementos

Para el uso de ecuaciones, anotadas como sigue:

$$\int_{lim^{-1}}^{lim^1} = \int \frac{lim^1}{lim^{-1}} = \left[\frac{1(-1)}{lim} \right]^2 = \frac{(0)^2}{lim} = \sqrt{lim} = 0 = 0 \rightarrow \infty \quad [1]$$

Debe ser editable y el número debe estar alineado a la derecha.

Metodología

Desarrollar dar el significado de las variables en la escritura lineal e importante es la comparación de los criterios utilizados.

Resultados

Los resultados serán por sección del libro.

Conclusiones

Explicar claramente los resultados y las posibilidades de mejora.

Anexos

Tablas y fuentes adecuadas.

El estándar internacional es de 7 páginas mínimo y máximo 14

Instructions for Scientific, Technological and Innovation Publication

Declaraciones

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses. No tienen intereses financieros o relaciones personales que pudieran haber influido en este libro.

Contribución de los autores

Especificar la contribución de cada investigador en cada uno de los puntos desarrollados en esta investigación.

Prot-

Benoit-Pauleter, Gerard: Contributed to the project idea, research method and technique.

Disponibilidad de datos y materiales

Indique la disponibilidad de los datos obtenidos en esta investigación.

Financiación

Indicar si la investigación recibió algún tipo de financiación.

Agradecimientos

Indicar si fueron financiados por alguna institución, Universidad o empresa.

Abreviaturas

Enumere las abreviaturas por orden alfabético.

ANN Artificial Neural Network

Referencias

Utilizar el sistema APA. No debe ir numerado, ni con viñetas, sin embargo si es necesario la numeración será porque se hace referencia o mención en alguna parte del Libro.

Utilice el alfabeto romano, todas las referencias que haya utilizado deben estar en alfabeto romano, incluso si ha citado un libro en cualquiera de los idiomas oficiales de las Naciones Unidas [inglés, francés, alemán, chino, ruso, portugués, italiano, español, árabe], debe escribir la referencia en alfabeto romano y no en cualquiera de los idiomas oficiales.

Las citas se clasifican en las siguientes categorías:

Antecedentes. La cita se debe a una investigación publicada anteriormente y orienta el documento que cita dentro de un área académica determinada.

Básicos. La cita tiene por objeto informar sobre conjuntos de datos, métodos, conceptos e ideas en los que los autores del documento que cita basan su trabajo.

Soporte. El artículo que cita informa de resultados similares. También puede referirse a similitudes en la metodología o, en algunos casos, a la reproducción de resultados.

Instructions for Scientific, Technological and Innovation Publication

Diferencias. El documento que cita informa mediante una cita de que ha obtenido resultados diferentes a los obtenidos en el documento citado. También puede referirse a diferencias en la metodología o a diferencias en el tamaño de las muestras que afectan a los resultados.

Discusiones. El artículo citante cita otro estudio porque proporciona una discusión más detallada sobre el tema tratado.

La URL del recurso se activa en el DOI o en el título del recurso.

Prot-

Mandelbrot, B. B. [2020]. [Negative dimensions and Hölders, multifractals and their Hölder spectra, and the role of lateral preasymptotics in science](#). Journal of Fourier Analysis and Applications Special. 409-432.

Requisitos de Propiedad Intelectual para la edición:

Firma auténtica en color del [Formato de Originalidad](#) de Autor y Coautores.

Firma auténtica en color del [Formato de Aceptación](#) de Autor y Coautores.

Firma auténtica en color del [Formato de Conflicto de Intereses](#) de Autor y Coautores.

Reserva a la Política Editorial

ECORFAN Books se reserva el derecho de hacer los cambios editoriales requeridos para adecuar la Obra Científica a la Política Editorial del ECORFAN Books. Una vez aceptada la Obra Científica en su versión final, el ECORFAN Books enviará al autor las pruebas para su revisión. ECORFAN® únicamente aceptará la corrección de erratas y errores u omisiones provenientes del proceso de edición de la revista reservándose en su totalidad los derechos de autor y difusión de contenido. No se aceptarán supresiones, sustituciones o añadidos que alteren la formación de la Obra Científica.

Código de Ética – Buenas Prácticas y Declaratoria de Solución a Conflictos Editoriales

Declaración de Originalidad y carácter inédito de la Obra Científica, de Autoría, sobre la obtención de datos e interpretación de resultados, Agradecimientos, Conflicto de intereses, Cesión de derechos y distribución.

La Dirección de ECORFAN-México, S.C reivindica a los Autores de la Obra Científica que su contenido debe ser original, inédito y de contenido Científico, Tecnológico y de Innovación para someterlo a evaluación.

Los Autores firmantes de la Obra Científica deben ser los mismos que han contribuido a su concepción, realización y desarrollo, así como a la obtención de los datos, la interpretación de los resultados, su redacción y revisión. El Autor de correspondencia de la Obra Científica propuesto requisitara el formulario que sigue a continuación.

Título de la Obra Científica:

- El envío de una Obra Científica a ECORFAN Books emana el compromiso del autor de no someterlo de manera simultánea a la consideración de otras publicaciones seriadas para ello deberá complementar el Formato de Originalidad para su Obra Científica, salvo que sea rechazado por el Comité de Arbitraje, podrá ser retirado.
- Ninguno de los datos presentados en esta Obra Científica ha sido plagiado ó inventado. Los datos originales se distinguen claramente de los ya publicados. Y se tiene conocimiento del testeo en PLAGSCAN si se detecta un nivel de plagio Positivo no se procederá a arbitrar.
- Se citan las referencias en las que se basa la información contenida en la Obra Científica, así como las teorías y los datos procedentes de otras Obras Científicas previamente publicados.
- Los autores firman el Formato de Autorización para que su Obra Científica se difunda por los medios que ECORFAN-México, S.C. en su Holding México considere pertinentes para divulgación y difusión de su Obra Científica cediendo sus Derechos de Obra Científica.
- Se ha obtenido el consentimiento de quienes han aportado datos no publicados obtenidos mediante comunicación verbal o escrita, y se identifican adecuadamente dicha comunicación y autoría.
- El Autor y Co-Autores que firman este trabajo han participado en su planificación, diseño y ejecución, así como en la interpretación de los resultados. Asimismo, revisaron críticamente el trabajo, aprobaron su versión final y están de acuerdo con su publicación.
- No se ha omitido ninguna firma responsable del trabajo y se satisfacen los criterios de Autoría Científica.
- Los resultados de esta Obra Científica se han interpretado objetivamente. Cualquier resultado contrario al punto de vista de quienes firman se expone y discute en la Obra Científica.

Copyright y Acceso

La publicación de esta Obra Científica supone la cesión del copyright a ECORFAN-Mexico, S.C en su Holding México para su ECORFAN Books, que se reserva el derecho a distribuir en la Web la versión publicada de la Obra Científica y la puesta a disposición de la Obra Científica en este formato supone para sus Autores el cumplimiento de lo establecido en la Ley de Ciencia y Tecnología de los Estados Unidos Mexicanos, en lo relativo a la obligatoriedad de permitir el acceso a los resultados de Investigaciones Científicas.

Título de la Obra Científica:

Nombre y apellidos del Autor de contacto y de los Coautores	Firma
1.	
2.	
3.	
4.	

Principios de Ética y Declaratoria de Solución a Conflictos Editoriales

Responsabilidades del Editor

El Editor se compromete a garantizar la confidencialidad del proceso de evaluación, no podrá revelar a los Árbitros la identidad de los Autores, tampoco podrá revelar la identidad de los Árbitros en ningún momento.

El Editor asume la responsabilidad de informar debidamente al Autor la fase del proceso editorial en que se encuentra el texto enviado, así como de las resoluciones del arbitraje a Doble Ciego.

El Editor debe evaluar los manuscritos y su contenido intelectual sin distinción de raza, género, orientación sexual, creencias religiosas, origen étnico, nacionalidad, o la filosofía política de los Autores.

El Editor y su equipo de edición de los Holdings de ECORFAN® no divulgarán ninguna información sobre la Obra Científica enviado a cualquier persona que no sea el Autor correspondiente.

El Editor debe tomar decisiones justas e imparciales y garantizar un proceso de arbitraje por pares justa.

Responsabilidades del Consejo Editorial

La descripción de los procesos de revisión por pares es dado a conocer por el Consejo Editorial con el fin de que los Autores conozcan cuáles son los criterios de evaluación y estará siempre dispuesto a justificar cualquier controversia en el proceso de evaluación. En caso de Detección de Plagio a la Obra Científica el Comité notifica a los Autores por Violación al Derecho de Autoría Científica, Tecnológica y de Innovación.

Responsabilidades del Comité Arbitral

Los Árbitros se comprometen a notificar sobre cualquier conducta no ética por parte de los Autores y señalar toda la información que pueda ser motivo para rechazar la publicación de la Obra Científica. Además, deben comprometerse a mantener de manera confidencial la información relacionada con la Obra Científica que evalúan.

Cualquier manuscrito recibido para su arbitraje debe ser tratado como documento confidencial, no se debe mostrar o discutir con otros expertos, excepto con autorización del Editor.

Los Árbitros se deben conducir de manera objetiva, toda crítica personal al Autor es inapropiada.

Los Árbitros deben expresar sus puntos de vista con claridad y con argumentos válidos que contribuyan al que hacer Científico, Tecnológica y de Innovación del Autor.

Los Árbitros no deben evaluar los manuscritos en los que tienen conflictos de intereses y que se hayan notificado al Editor antes de someter la Obra Científica a evaluación.

Responsabilidades de los Autores

Los Autores deben garantizar que sus Obras Científicas son producto de su trabajo original y que los datos han sido obtenidos de manera ética.

Los Autores deben garantizar no han sido previamente publicados o que no estén siendo considerados en otra publicación seriada.

Los Autores deben seguir estrictamente las normas para la publicación de Obra Científica definidas por el Consejo Editorial.

Los Autores deben considerar que el plagio en todas sus formas constituye una conducta no ética editorial y es inaceptable, en consecuencia, cualquier manuscrito que incurra en plagio será eliminado y no considerado para su publicación.

Los Autores deben citar las publicaciones que han sido influyentes en la naturaleza de la Obra Científica presentado a arbitraje.

Servicios de Información

Indización - Bases y Repositorios

VLEX (Plataforma global de inteligencia jurídica)

RESEARCH GATE (Alemania)

MENDELEY (Gestor de Referencias bibliográficas)

GOOGLE SCHOLAR (Índices de citaciones-Google)

REDIB (Red Iberoamericana de Innovación y Conocimiento Científico- CSIC)

Servicios Editoriales

Identificación de Citación e Índice H

Administración del Formato de Originalidad y Autorización

Testeo de Books con PLAGSCAN

Evaluación de Obra Científica

Emisión de Certificado de Arbitraje

Edición de Obra Científica

Maquetación Web

Indización y Repositorio

Publicación de Obra Científica

Certificado de Obra Científica

Facturación por Servicio de Edición

Política Editorial y Administración

Park Pedregal Business 3580 – Adolfo Ruiz Cortines Boulevard, CP-01900. San Jeronimo Aculco Álvaro Obregón - Mexico City. Tel: +52 1 55 6159 2296, +52 1 55 1260 0355, +52 1 55 6034 9181; E-mail: contact@ecorfan.org www.ecorfan.org

ECORFAN®

Editor en Jefe

VARGAS-DELGADO, Oscar. PhD

Director Ejecutivo

RAMOS-ESCAMILLA, María. PhD

Director Editorial

PERALTA-CASTRO, Enrique. MsC

Diseñador Web

ESCAMILLA-BOUCHAN, Imelda. PhD

Programador web

LUNA-SOTO, Vladimir. PhD

Asistente Editorial

TREJO-RAMOS, Iván BsC

Filólogo

RAMOS-ARANCIBIA, Alejandra. BsC

Publicidad y Patrocinio

(ECORFAN®- Mexico- Bolivia- Spain- Ecuador- Cameroon- Colombia- El Salvador- Guatemala- Nicaragua- Peru- Paraguay- Democratic Republic of The Congo- Taiwan), sponsorships@ecorfan.org

Licencias del Sitio

03-2010-032610094200-01-Para material impreso, 03-2010-031613323600-01-Para material electrónico, 03-2010-032610105200-01-Para material fotográfico, 03-2010-032610115700-14-Para Compilación de Datos, 04 -2010-031613323600-01-Para su página Web, 19502-Para la Indización Iberoamericana y del Caribe, 20-281 HB9-Para la Indización en América Latina en Ciencias Sociales y Humanidades, 671-Para la Indización en Revistas Científicas Electrónicas España y América Latina, 7045008-Para su divulgación y edición en el Ministerio de Educación y Cultura-España, 25409-Para su repositorio en la Biblioteca Universitaria-Madrid, 16258-Para su indexación en Dialnet, 20589-Para Indización en el Directorio en los países de Iberoamérica y el Caribe, 15048-Para el registro internacional de Congresos y Coloquios. financingprograms@ecorfan.org

Oficinas de Gestión

Park Pedregal Business 3580 - Adolfo Ruiz Cortines Boulevard, CP-01900. San Jeronimo Aculco Álvaro Obregón - Mexico City.

21 Santa Lucia, CP-5220. Libertadores -Sucre - Bolivia.

38 Matacerquillas, CP-28411. Moralzarlal -Madrid-Spain.

18 Marcial Romero, CP-241550. Avenue, Salinas I - Santa Elena-Ecuador.

1047 Avenida La Raza - Santa Ana, Cusco-Peru.

Boulevard de la Liberté, Immeuble Kassap, CP-5963.Akwa- Douala-Cameroon.

Avenida Suroeste, San Sebastian - León-Nicaragua.

31 Kinshasa 6593- Republique Démocratique du Congo.

Avenida San Quentin, R 1-17 Miralvalle - San Salvador-El Salvador.

16 kilometers, U.S. highway, Terra Alta house, D7 Mixco Zone 1-Guatemala.

105 Alberdi Rivarola Capitán, CP-2060. Luque City- Paraguay.

69 Street YongHe District, Zhongxin. Taipei-Taiwan.

43 Street # 30 -90 B. El Triunfo CP.50001. Bogotá-Colombia.

