

COMISIÓN DE CONTROL ANALÍTICO Y AMPLIACIÓN DE COBERTURA

MÉTODO DE PRUEBA PARA LA ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD MICROBIANA POR LA TÉCNICA DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP), DETECCIÓN DE COLIFORMES TOTALES, COLIFORMES FECALES y *Escherichia coli*
CCAYAC-M-004/8

1. OBJETIVO

Establecer la metodología para la estimación de la densidad de Coliformes Totales, Coliformes Fecales y *Escherichia coli* por la técnica del número más probable presentes en muestras de alimentos y agua.

2. CAMPO DE APLICACIÓN

Este método es aplicable para la detección de coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli*, especialmente en productos que se encuentran en bajas concentraciones de microorganismos (< 10 UFC/g o ml) Ejemplo: Leche, agua y para aquellos alimentos cuyas características particulares puedan interferir en la exactitud de la cuenta de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

3. FUNDAMENTO

Introducción

Actualmente se utilizan tres grupos de indicadores microbianos con diferentes aplicaciones. La detección de bacterias coliformes se usa como indicador de la calidad sanitaria de agua o como indicador de condiciones sanitarias en el procesamiento de alimentos. Los coliformes fecales continúan siendo el indicador de elección para moluscos bivalvos y sus aguas de cultivo y *E. coli* como indicador de contaminación fecal reciente o condiciones higiénicas inadecuadas. Casi todos los métodos utilizados para la detección de estos indicadores, son métodos de enumeración basados en la fermentación de la lactosa. El método del número más probable consiste de una prueba presuntiva y confirmativa. La serie de 3 tubos generalmente 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 y 10 tubos dependiendo de la contaminación esperada y del grado de exactitud deseado.

Se basa en la dilución de la muestra en tubos múltiples, de tal forma que todos los tubos de la menor dilución sean positivos y todos los tubos de la dilución mayor sean negativos. El resultado positivo se demuestra por la presencia de gas y/o crecimiento microbiano propiedad de los microorganismos coliformes para producir gas a partir de la fermentación de lactosa dentro de las 48 horas de incubación a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (coliformes) y a $45,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ (coliformes fecales y *E. coli*).

ELABORO	REVISO	AUTORIZO	FECHA
FABIOLA CASTAÑEDA LÓPEZ ARTURO VARGAS TAPIA PRANDIZ CARLOS DEHMER MARIEL QUÍMICOS ANALISTAS	CÉSAR OMAR GÁLVEZ GONZÁLEZ GERENTE DE ANÁLISIS Y DESARROLLO DE PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS	RAÚL YANKO MONTAÑO CHÁVEZ DIRECTOR EJECUTIVO DE CONTROL ANALÍTICO	16-NOV-2011

Para obtener el Número Más Probable (NMP) en los resultados se aplica la teoría de la probabilidad, lo cual tiene como condición lo siguiente:

- Una distribución aleatoria de las bacterias que existen en la muestra.
- Las bacterias se encuentran como entidades no agrupadas.
- Los microorganismos presentes en la muestra crecerán en el medio cuando son incubados y se mantengan en las condiciones adecuadas para su desarrollo.

Consideraciones

Si se espera una cuenta microbiana alta, la muestra deberá diluirse para dar cumplimiento a las condiciones. La forma más común de realizar esta prueba es mediante diluciones decimales y usando un inóculo en series de 3, 5 o 10 tubos en serie. A medida que el número de tubos inoculados para cada dilución aumenta, se reducen los límites de confianza.

4. EQUIPO

- Baño de agua con: recirculación continua, tapa de dos aguas y termostato que evite variaciones mayores a 0,1°C.
- Lámpara de luz ultravioleta de longitud (365 nm) 4 watts.
- Incubadora de 35 °C ± 0,5 °C
- Balanza con capacidad adecuada y sensibilidad de 0,1 g
- Motor de licuadora u homogenizador peristáltico
- Potenciómetro con sensibilidad de 0,1 de unidad de pH
- Mecheros Bunsen
- Autoclave que alcance una temperatura de 121 °C con termómetro calibrado y previamente evaluada con esporas de *Bacillus stearothermophilus*

5. MATERIALES

- Tubos de cultivo de 18 x 200 y de 16 x 160 mm con tapón de rosca
- Campanas de fermentación de 5 cm de largo por 5 mm de diámetro (campanas de Durham)
- Gradillas de plástico y metal
- Asas bacteriológicas de 3 a 3,5 mm de diámetro con porta asa
- Lentes protectores.
- Termómetros de inmersión con división mínima de 0,5 °C para incubadora calibrado o verificado
- Termómetro de máximas para autoclave con división mínima de 0,5 °C calibrado
- Termómetro de inmersión de 1 - 55°C con subdivisiones de 0,1 °C, calibrado o verificado
- Cinta testigo para procesos de esterilización por calor húmedo
- Vasos de licuadora estériles o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico
- Pipetas graduadas bacteriológicas de 1, 2, 5 y 10 ml
- Probetas de 100, 500 y 1000 ml
- Botellas de dilución de vidrio de borosilicato con tapa de rosca
- Frascos con capacidad 500 ml con tapa de rosca
- Espátulas, cucharas, cuchillos, pinzas.
- Cuchillos desconchadores

6. MEDIOS DE CULTIVO

6.1 Caldo lauril

Ingredientes:

Bacto triptosa	20,0 g
Bacto lactosa	5,0 g
Fosfato potásico dibásico	2,75 g
Fosfato potásico monobásico	2,75 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Lauril sulfato de sodio	0,1 g
Agua destilada	1000,0 ml

pH final: $6,8 \pm 0,2$ a 25°C .

Preparación:

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada, ajustar el pH si es necesario y distribuir en tubos de ensaye con campanas de Durham. Adicionar el volumen de medio de acuerdo con la siguiente tabla cuando se prepare a partir de medio completo deshidratado. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C .

Preparación de caldo lauril triptosa

INÓCULO (ml)	CANTIDAD DE MEDIO POR TUBO (ml)	VOLUMEN DE MEDIO MAS INÓCULO (ml)	CALDO LAURIL TRIPTOSA REQUERIDO g/l
1	10 o más	11 o más	35,6
10	10	20	71,2
10	20	30	53,4
20	10	30	106,8
100	50	150	106,8
100	35	135	137,1
100	20	120	213,6

6.2 Caldo lactosado

NOTA: Este medio se puede utilizar alternativamente para muestras de agua de mar, de áreas de cultivo o para moluscos bivalvos.

Ingredientes:

Extracto de carne	3,0 g
Peptona de gelatina	5,0 g
Lactosa	5,0 g
Agua destilada	1000,0 ml

Preparación:

Disolver los ingredientes en un litro de agua, calentar ligeramente si es necesario hasta que el medio este completamente disuelto o utilizar el medio completo deshidratado, siguiendo las instrucciones del fabricante. Ajustar el pH final de tal manera que después de la esterilización éste

sea de $6,9 \pm 0,2$. Distribuir en tubos de ensayo con tapa de rosca con campana de Durham, de acuerdo con la siguiente tabla.

Preparación del caldo lactosado para fórmulas deshidratadas.

VOLUMEN (ml)			Cantidad en gramos (g) de caldo lactosado deshidratado usado, por un litro de agua destilada
INÓCULO	MEDIO	INÓCULO y MEDIO	
1	10 o más	11 o más	13,0
10	10	20	26,0
10	20	30	19,5
100	50	150	39,0
100	35	135	50,1
100	20	120	78,0

Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C. Enfriar rápidamente para evitar una exposición excesiva al calor.

6.3 Caldo verde brillante lactosa bilis

Ingredientes:

Peptona	10 g
Lactosa	10 g
Oxgall	20 g
Verde brillante	0,0133 g
Agua destilada	1 litro
pH $7,2 \pm 0,1$.	

Preparación:

Disolver la peptona y la lactosa en 500 ml de agua destilada. Adicionar 20 g de Oxgall disueltos en 200 ml de agua destilada. El pH de la solución debe ser de 7,0 a 7,5. Mezclar y agregar agua hasta un volumen de 975 ml. Ajustar el pH a 7,4. Adicionar 13,3 ml de una solución acuosa de verde brillante al 0,1% en agua destilada, agregar agua hasta completar un litro. Distribuir en tubos de fermentación, asegurando que el medio cubra las campanas de fermentación de Durham. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

6.4 Caldo A-1

Este medio se debe preparar a partir de ingredientes.

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

Preparación:

Calentar hasta disolver los ingredientes sólidos, agregar el Tritón X-100 y ajustar el pH a $6,9 \pm 0,1$. Distribuir en tubos de fermentación asegurando que el medio cubra las campanas de fermentación de Durham, esterilizar a 121°C por 10 minutos y guardar el medio a temperatura ambiente en un lugar oscuro por no más de 7 días.

Para muestras de 10 ml preparar el medio a doble concentración. El medio puede formar un precipitado particularmente en el de doble concentración.

6.5 Caldo EC (*E. coli*)

Ingredientes:

Bacto triptosa	20,0 g
Bacto lactosa	5,0 g
Bacto sales biliares No. 3	1,5 g
Fosfato dipotásico	4,0 g
Fosfato monopotásico	1,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agua destilada	1000,0 ml
pH final: $6,9 \pm 0,2$ a 25°C .	

Preparación:

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada y calentar ligeramente para que se disuelva por completo. Ajustar el pH si es necesario. Distribuir en porciones de 10 ml en tubos de ensaye con campanas de Durham y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C .

6.6 Agar McConkey

Ingredientes:

Proteasa peptona o polipeptona	3,0 g
Peptona o gelizante	17,0 g
Lactosa	10,0 g
Sales biliares No. 3	1,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,001 g
Agar	13,5 g
Agua destilada	1000,0 ml
pH final: $7,1 \pm 0,2$ a 25°C	

Preparación:

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Calentar hasta ebullición para disolver por completo. Ajustar el pH si es necesario. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a $50 - 60^{\circ}\text{C}$ y vaciar en cajas Petri.

6.7 Agar eosina azul de metileno de Levin (EMB-L)

Ingredientes:

Peptona	10,0 g
Lactosa	10,0 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
Eosina Y	0,4 g
Azul de metileno	0,065 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 7,1 ± 0,2

Preparación:

Disolver la peptona, el fosfato y el agar en un litro de agua, calentar hasta ebullición para la disolución completa, distribuir en porciones de 100 o 200 ml y esterilizar a no más de 121°C por 15 minutos.

Fundir antes de su uso y adicionar a cada porción de 100 ml:

- 5 ml de solución de lactosa al 20% estéril
- 2 ml de solución acuosa de eosina al 2%
- 4,3 ml de solución acuosa de azul de metileno al 0,15%.

Cuando se use el producto deshidratado, disolver todos los ingredientes de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

6.8 Caldo triptona al 1% (triptofano)

Ingredientes:

Triptona o tripticasa	10 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 6,9 ± 0,2

Preparación:

Disolver los ingredientes, distribuir en porciones de 5 ml en tubos de ensaye de 16 x 125 o 16 x 150 mm y esterilizar a 121°C por 15 minutos.

6.9 Caldo MR-VP

Medio 1

Ingredientes:

Peptona tamponada	7 g
Glucosa	5 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 6,9 ± 0,2

Preparación:

Disolver los ingredientes con calentamiento suave si es necesario, distribuir en volúmenes de 10 ml en tubos de ensaye de 16 x 150 mm y esterilizar a 118 - 121°C por 15 minutos.

6.10 Caldo citrato de Koser

Ingredientes:

NaNH ₄ HPO ₄ •4H ₂ O	1,5 g
KH ₂ PO ₄ (monobásico)	1,0 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,2 g
Citrato de sodio •2H ₂ O	3,0 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 6,7 ± 0,2.

Preparación:

Distribuir 5 ml del caldo preferentemente en tubos de ensaye con tapa de rosca y esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Esta formulación se recomienda en los Métodos de Análisis Oficial de AOAC y en los Métodos Estándares para el Análisis de Agua y Aguas de Desecho (APHA). Este difiere de la composición del medio deshidratado disponible comercialmente y es recomendable su uso.

6.11 Citrato de Simmons

Ingredientes:

NaNH ₄ HPO ₄ •4H ₂ O	1,5 g
KH ₂ PO ₄ (monobásico)	1,0 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,2 g
Citrato de sodio •2H ₂ O	3,0 g
NaCl	5,0 g
Agar	5 g
Azul de bromotimol	0,08 g
Agua destilada	1000 ml

pH final 6,9 ± 0,2

Preparación:

Disolver los ingredientes y calentar a ebullición por 1 minuto. Distribuir en porciones de 5 ml, en tubos con tapón de rosca, esterilizar por 15 minutos a 121 °C y dejar solidificar en una superficie lo suficientemente inclinada para tener una profundidad de 3 cm.

7. REACTIVOS

7.1 Regulador de fosfatos solución concentrada

Ingredientes:

KH ₂ PO ₄	34 g
Agua destilada	500 ml

Preparación:

Solución concentrada: Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1,0 N, llevar a un litro con agua y esterilizar durante 15 minutos a 121 °C. Conservar en refrigeración.

Solución de trabajo: Tomar 1,25 ml de la solución concentrada y llevar a un litro con agua. Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera. Esterilizar a 121° C durante 15 minutos. Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales.

7.2 Diluyente de peptona al 0,1%

Ingredientes:

Peptona	1 g
Agua destilada	1 litro
pH 7,0 ± 0,2	

Preparación:

Disolver la peptona en el agua destilada y esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

7.3 Reactivo de Kovacs

Ingredientes:

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

Preparación:

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

Para la prueba de indol:

Adicionar de 0,2 a 0,3 ml del reactivo a 5 ml del cultivo de bacteria en caldo triptona. Se considera una prueba positiva cuando desarrolla un color rojo en la superficie del tubo.

7.4 Reactivo de Voges-Proskauer (VP)

Solución 1

Ingredientes:

alfa-naftol	5 g
Alcohol absoluto	100 ml

Solución 2

Ingredientes:

Hidróxido de potasio	40 g
Agua destilada	Para llevar a 100 ml

Prueba de Voges-Proskauer (VP)

Transferir 1 ml del cultivo a probar con 48 horas de incubación a un tubo de ensaye, adicionar 0,6 ml de la solución 1 y 0,2 ml de la solución 2, agitar después de la adición de cada solución. Para intensificar y acelerar la reacción adicionar unos cuantos cristales de creatina y mezclar. Dejar a temperatura ambiente. Leer resultados después de 4 horas de adicionar los reactivos. El desarrollo de una coloración rojo rosado es una prueba positiva

7.5 Indicador rojo de metilo

Ingredientes:

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

Preparación:

Disolver el rojo de metilo en 300 ml de etanol y aforar a 500 ml con agua destilada.

7.6 Reactivos para la coloración de Gram

Cristal violeta

Solución A

Ingredientes:

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

Solución B

Ingredientes:

Oxalato de amonio	0,8 g
Agua destilada	80 ml

Preparación:

Mezclar la solución A y B y filtrar a través de un papel filtro Almacenar por 24 horas

Iodo de Gram

Ingredientes:

Iodo	1g
Ioduro de potasio (KI)	2 g
Agua destilada	300 ml

Preparación:

Colocar el KI en un mortero, adicionar el iodo, triturar con el pistilo por 5 a 10 segundos, adicionar 1 ml de agua y triturar. Adicionar 5 ml de agua y triturar. Adicionar 10 ml de agua y triturar. Vaciar esta solución en una botella de reactivo, enjuagar el mortero y el pistilo con la cantidad de agua necesaria para completar 300 ml.

Colorante de contraste (solución concentrada)

Ingredientes:

Safranina O	2,5 g
Etanol al 95%	100 ml

Preparación:

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

Procedimiento para la tinción de Gram

1. Fijar con calor moderado los frotis de la muestra a teñir.
2. Adicionar la solución de cristal violeta al frotis.
3. Dejar actuar por un minuto.
4. Lavar con agua corriente y escurrir.
5. Aplicar la solución de yodo por un minuto.
6. Lavar con agua corriente y escurrir.
7. Decolorar con etanol al 95% hasta que la coloración azul deje de fluir (aproximadamente 30 segundos).
8. Inmediatamente después enjuagar con agua corriente.
9. Escurrir.
10. Aplicar el colorante de contraste (safranina) por 30 segundos.
11. Enjuagar, escurrir y secar al aire. Examinar al microscopio.

7.7 Medio EC-MUG y Lauril Sulfato-MUG

Preparación:

Preparar el caldo EC o caldo lauril y adicionar 50 mg de 4-metilumbelliferyl-beta-D-glucurónido (MUG) por litro antes de esterilizar (121°C por 15 minutos). El caldo EC-MUG está comercialmente disponible.

8. CONDICIONES DE PRUEBA

El laboratorio donde sean procesadas las muestras no debe rebasar de 15 UFC en 15 minutos de exposición de una placa de agar soya tripticaasa o agar peptona-glucosa extracto de levadura.

9. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

9.1 Procedimiento para Agua y hielo

A. Prueba presuntiva

- A.1 Agitar la muestra que debe ser de 100 ml como mínimo. La cantidad de tubos que se utilicen dependerá de la calidad y características del agua que se va a analizar.

Agua para uso y consumo humano y envasada, transferir directamente 5 porciones de 20 ml, 10 porciones de 10 ml o una porción de 100 ml. Continuar como se indica en el inciso A.2.

Consultar las tablas de los incisos 6.1 y 6.2 para seleccionar las diferentes concentraciones de caldo lauril de acuerdo a los diferentes volúmenes de muestra a inocular.

Agua para uso recreativo. Utilizar 5 tubos de caldo lauril por cada porción de 10, 1 y 0,1 ml, hacer diluciones decimales cuando se espere una densidad microbiana alta. Continuar como se indica en el inciso A.2.

Agua de mar para el cultivo de moluscos bivalvos. Utilizar 5 o 3 tubos por dilución (dependiendo del grado de exactitud deseado), con porciones de 10, 1 o 0,1 ml. Hacer diluciones cuando se espere una densidad microbiana alta.

Coliformes fecales Directos

Utilizar caldo lactosado para la prueba presuntiva o el medio A-1 para la prueba de coliformes fecales directa, inoculando 5 o 3 tubos por dilución con porciones de 10, 1 y 0,1 ml en caldo A-1. Incubar por 3 horas a $35 \pm 0,5$ °C, colocar los tubos a un baño de agua a $44,5 \pm 0,2$ °C por 21 ± 2 horas

Interpretación: la producción de gas en cualquiera de los tubos de caldo A-1 dentro de las 24 horas indica una reacción positiva a coliformes de origen fecal. Para calcular el NMP/100ml consultar las tablas correspondientes (Tablas 2 u 8).

Hielo. Fundir el hielo a 45°C y realizar el análisis como agua para uso y consumo humano.

- A.2 Incubar los tubos de caldo lauril inoculados a $35 \pm 0,5$ °C. Examinar los tubos a las 24 horas y observar si hay formación de gas. Anotar los resultados. Si la formación de gas no se observa, incubar 24 horas más y anotar los resultados.

B. Prueba confirmativa

- B.1 De cada tubo que muestre formación de gas, tomar una asada y sembrar en un número igual de tubos con el medio indicado para la prueba confirmativa; para bacterias coliformes totales, utilizar el caldo verde brillante lactosa bilis y para coliformes fecales utilizar caldo EC. Inocular en tubos de caldo EC un control positivo de *Escherichia coli* y un control negativo de *Enterobacter aerogenes* e incubar con las muestras.

- B.2 Incubar los tubos para prueba de coliformes totales a $35 \pm 0,5$ °C por 48 ± 2 horas y para la prueba de coliformes fecales a $45,5 \pm 0,2$ °C en baño de agua con recirculación continua durante 24 horas, observar si hay formación de gas, registrar la lectura, en caso de no haber formación de gas, incubar 24 horas más. Utilizar estos resultados para calcular el número más probable (NMP) de coliformes totales y coliformes fecales respectivamente. Consultar el punto 10 de cálculos.

NOTA: Para todos los alimentos que se les determine coliformes fecales, la incubación debe ser a 45.5 ± 0.2 °C por 24 a 48 horas, excepto para muestras de agua, moluscos bivalvos y agua de mar, cuya temperatura de incubación debe ser de 44.5 ± 0.2 °C durante 24 horas.

C. Prueba complementaria

Esta es una prueba optativa de control de calidad para todas las muestras de agua que tiene como objetivo confirmar el 10% de los tubos positivos de coliformes totales en caldo verde brillante.

- C.1 Tomar una asada de cada uno de los tubos positivos de caldo verde brillante y sembrar por estría cruzada en agar McConkey. Incubar a $35 \pm 0,5$ °C por 24 ± 2 horas. Observar las colonias típicas fermentadoras de color rojo que pueden estar rodeadas de un halo opaco de precipitación de sales biliares.
- C.2 Seleccionar 1 o más colonias aisladas con las características anteriores o lo más parecido a esta descripción, e inocular igual número de tubos de fermentación con caldo lauril triptosa y a tubos con agar nutritivo inclinado; continuar como se indica en A.2. Hacer tinción de Gram a partir del crecimiento en el agar nutritivo para observación de la morfología microscópica de las colonias.

Interpretación: La formación de gas en los tubos de caldo lauril sulfato dentro de las 48 ± 3 h y la demostración de bacterias Gram negativas, en forma de bacilos no esporulados constituyen una prueba positiva a la presencia del grupo coliforme.

D. Prueba confirmativa para *Escherichia coli* (por identificación bioquímica)

- D.1 Tomar una asada de cada uno de los tubos positivos de caldo EC y sembrar por estría cruzada en agar EMB-L para su aislamiento.
- D.2 Incubar las placas invertidas a 35°C por 18-24 horas.
- D.3 Seleccionar dos colonias de cada placa con la siguiente morfología colonial: colonias con centro negro, planas con o sin brillo metálico y sembrarlas en agar cuenta estándar (placa o agar inclinado), para realizar las pruebas de morfología microscópica y pruebas bioquímicas. Incubar las placas o tubos a 35°C por 18-24 horas.
- D.4 Si no hay colonias con morfología típica, probar una o más colonias lo más parecido a *E. coli* de cada placa.
- D.5 Hacer un frotis y teñirlo por Gram. Observar al microscopio la presencia de bacilos cortos o cocobacilos Gram-negativos.
- D.6 Pruebas bioquímicas: Indol, Rojo de metilo, Voges Proskauer, Citrato (IMViC).
 - a. Producción de indol
Inocular un tubo con caldo triptona e incubarlo a $35 \pm 0,5$ °C por 24 ± 2 horas. Adicionar 0,2 - 0,3 ml de reactivo de Kovacs. La presencia de una coloración roja en la superficie del tubo se considera una prueba positiva.
 - b. Voges-Proskauer (VP)

Inocular un tubo con caldo MR-VP e incubar a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 48 ± 2 horas. Transferir 1 ml a un tubo de 13 x 100 mm. Adicionar 0,6 ml de solución de alfa naftol y 0,2 ml de hidróxido de potasio al 40% y agitar. Se considera una prueba positiva cuando se desarrolla un color rojo rosado de 15 a 30 minutos.

c. Rojo de metilo

Inocular un tubo adicional con caldo MR-VP e incubar a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 48 ± 2 horas. Adicionar 5 gotas de solución de rojo de metilo. Se considera una prueba positiva cuando se desarrolla un color rojo. Un color amarillo definido es una prueba negativa.

d. Citrato

Sembrar con inoculo ligero un tubo con caldo citrato de Koser; evitar turbiedad en el tubo. Incubar a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 96 horas. Una reacción positiva se observa mediante el desarrollo de turbiedad detectable.

Se puede utilizar también citrato de Simmons el cual se debe inocular por estría. Incubar a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Una prueba positiva se observa mediante crecimiento y un cambio a coloración azul; la ausencia de crecimiento se considera una prueba negativa.

Interpretación de resultados de pruebas bioquímicas

Todos los cultivos que fermenten la lactosa con producción de gas dentro de las 48 horas a 35°C , sean bacilos o cocobacilos Gram negativos no esporulados y se obtengan las siguientes combinaciones para el IMViC:

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

Calcular el NMP de *E. coli* basada en la proporción de los tubos positivos de caldo EC confirmados. Consultar el punto 10 de cálculos.

E. Prueba confirmativa para *Escherichia coli* (por el método de EC-MUG) para moluscos bivalvos

Fundamento

Alrededor del 96% de las cepas de *E. coli* incluso las cepas anaerogénicas producen la enzima beta-glucuronidasa (GUD), la cual rompe el sustrato específico 4-metilumbelliferyl-beta-D-glucurónido (MUG) en 4-metilumbeliferona (MU), que al ser expuesto a una fuente de luz ultravioleta (UV) de onda larga (365 nm) produce una fluorescencia azul, fácil de observar cuando el MUG es incorporado al caldo EC o al caldo lauril se puede identificar *E. coli*.

Una excepción es la *E. coli* enterohemorrágica serotipo O157:H7, que es GUD negativa; por lo que es común que esta prueba se utilice para diferenciar este serotipo de las demás *E. coli*.

La producción de GUD por otras bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* es rara. Algunas *Shigellas* (44-58%) y *Salmonellae* (20-29%) son GUD positivas, sin embargo no se considera una desventaja de esta prueba para su uso en salud pública.

El MUG puede ser incorporado a casi cualquier medio que se utilice para la detección de *E. coli*. Pero en algunos medios como el EMB, que contiene compuestos fluorescentes no es adecuado ya que pueden enmascarar la fluorescencia del MU.

E.1 Prueba presuntiva

Seguir lo indicado en el punto A del inciso 9.1 o punto A del inciso 9.2 según sea el caso.

E.2 Prueba confirmativa

De cada tubo que muestre formación de gas, tomar una asada y sembrar en un número igual de tubos con medio de confirmación EC-MUG. Inocular dos tubos con caldo EC-MUG con una cepa de *E. coli* como control positivo y *K. pneumoniae* como control negativo. Incubar estos tubos con un tubo adicional de caldo EC-MUG sin inocular con los tubos de las muestras, a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ en baño de agua, durante 24 horas. Observar si hay formación de gas. Irradiar los tubos con una fuente de luz ultravioleta, observar fluorescencia Usar lentes de protección para esta prueba. Utilizar estos resultados para calcular de el número más probable (NMP) de *E. coli*. Consultar el punto 10 de cálculos.

NOTA: Algunas cepas de *E. coli* (menos del 10 %) son anaerogénicas (gas negativo), pero pueden ser MUG positivas.

F. Prueba para detectar *E. coli* en alimentos refrigerados o congelados excepto moluscos bivalvos

FUNDAMENTO

Cuando el MUG es incorporado al caldo lauril, los coliformes pueden ser enumerados en base a la producción gas a partir de la lactosa y *E. coli* es identificada por la fluorescencia al incidir luz ultravioleta al medio dentro de las 24 horas.

En alimentos refrigerados o congelados a excepción de moluscos bivalvos. La carne de moluscos bivalvos contiene naturalmente GUD y pueden dar falsos positivos, por lo cual el análisis se realiza a partir de una prueba presuntiva con caldo lauril como lo menciona el inciso E del punto 9.3.3 y caldo de confirmación el EC-MUG.

PRECAUCION: Observar los tubos con lámpara de luz ultravioleta (365 nm 6 watt) en la oscuridad. Cuando se use una lámpara de más poder como de 15 watt, usar lentes de protección. Previamente al uso de MUG, examinar todos los tubos para verificar auto fluorescencia. El óxido de cerio, el cual a veces es adicionado al vidrio, interfiere con la prueba del MUG. Usar cepas control positivo y negativo para la reacción de MUG.

F.1 Prueba presuntiva

Seguir lo indicado en el punto A de 9.1 o punto A de 9.2 utilizando caldo lauril con MUG en vez de caldo lauril. Inocular un tubo con una cepa de *E. coli* GUD positiva como control (ATCC 25922). Además inocular otro tubo con *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) como control negativo, para facilitar la diferenciación entre los tubos que presenten solo crecimiento y crecimiento con fluorescencia. Incubar los tubos por 24 a 48

± 2 horas a 35 °C. Examinar cada tubo con crecimiento (turbiedad y gas), después, observar los tubos en la oscuridad con una lámpara de luz ultravioleta. Una prueba positiva presuntiva para *E. coli* es la presencia de fluorescencia en el tubo. La lectura a las 24 horas de incubación, identifica a *E. coli* en un 83-95%, mientras que a las 48 horas de incubación la identifica es en un 96-100%.

F.2 Prueba confirmativa

Confirmar todos los tubos positivos estriando en una placa de agar L-EMB, incubar a 35°C por 24 ± 2 horas y continuar como en el punto 9.1 inciso D. Calcular el NMP de *E. coli* basada en la confirmación de tubos en las 3 diluciones consecutivas.

9.2 Procedimiento para Alimentos

A. Prueba presuntiva

A.1 Pesar 25 o 50 g del alimento en 225 o 450 ml de regulador de fosfatos y moler por 2 minutos en vaso de licuadora u homogeneizador peristáltico, el volumen total en el vaso debe cubrir totalmente las aspas. Las muestras congeladas deben mantenerse en refrigeración (2 - 5° C) un máximo de 18 horas antes de su análisis, sin llegar a la descongelación.

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.

Preparar diluciones decimales con regulador de fosfatos. La cantidad de diluciones dependerá de la densidad de coliformes esperada. Agitar las diluciones 25 veces en un arco de 30 cm por 7 segundos. Transferir volúmenes de 1 ml a 3 tubos con 10 ml de caldo lauril sulfato de sodio por cada dilución; por lo menos tres diluciones consecutivas (el volumen que se transfiera nunca debe ser menor del 10% de la capacidad total de la pipeta). Mantener la pipeta en ángulo de tal manera que descansa sobre el borde del tubo. El tiempo entre la homogeneización de la muestra y la inoculación de los tubos no debe exceder de 15 a 20 minutos

Utilizar como medio de enriquecimiento caldo lauril triptosa y continuar como en el punto A.2 de 9.1

B. Prueba confirmativa

Continuar como en el punto B de 9.1 considerando que si la formación de gas no se observa, continuar la incubación 24 horas más.

9.3 Procedimiento para Moluscos bivalvos

Este método es aplicable a los moluscos bivalvos de producción nacional e importación, en concha, desconchados frescos y congelados.

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 200 g de licor y carne. Por otro lado 10 a 12 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 20 a 30 piezas de estas especies para obtener el peso adecuado.

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

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

Procedimiento para Moluscos en concha, desconchados frescos y congelados

Pesar el total de la muestra, máximo 200 g (carne y licor) y adicionar igual cantidad de regulador de fosfatos o diluyente de peptona al 0,5% para obtener una dilución 1:2. Homogeneizar por 2 minutos.

Pesar 20 g de la mezcla anterior en 80 ml de regulador de fosfatos o diluyente de peptona al 0,5%, agitar la dilución 25 veces en 7 segundos, haciendo un arco de 30 cm 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 y agitar como se indicó anteriormente.

A. Prueba Presuntiva

Inocular 5 tubos con 10 ml de caldo lauril sulfato concentración simple con 2 ml de la dilución 1:2 que equivale a 1 g de molusco.

Inocular 5 tubos con 10 ml de caldo lauril sulfato concentración simple con 1 ml de la dilución 1:10 que equivale a 0,1 g de molusco.

Inocular 5 tubos con 10 ml de caldo lauril sulfato concentración simple con 1 ml de la dilución 1:100 que equivale a 0,01 g de molusco.

Inocular 5 tubos con 10 ml de caldo lauril sulfato concentración simple con 1 ml de la dilución 1:1000 que equivale a 0,001 g de molusco.

La cantidad de muestra a inocular debe ser tal que la menor dilución dé resultados positivos en todos o la mayoría de los tubos y la mayor dilución de resultados negativos en todos o en la mayoría de los tubos. Continuar como en el punto A.2 de 9.1

B. Para la prueba confirmativa de coliformes fecales

Continuar como en B de 9.1 Observar la formación de gas en los tubos de caldo EC a las 24 \pm 2 h. Utilizar estos resultados para calcular el número más probable (NMP) para coliformes fecales de acuerdo a la tabla 2, tomando en cuenta que la densidad se expresa en NMP/100g de muestra. Consultar el punto 10 de cálculos.

10. CÁLCULOS

Calcular la densidad microbiana en número más probable de bacterias coliformes, bacterias coliformes fecales y *E.coli* consultando las tablas correspondientes de acuerdo con la serie de tubos empleados, las diluciones utilizadas y de la cantidad de muestra inoculada como se describe a continuación:

ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD MICROBIANA POR LA TÉCNICA DE NMP

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

Las tablas 5-7 presentan la estimación estadística de los valores del NMP que corresponden al 95% de límite de confianza cuando se utilizan 3, 5 y 10 tubos. Otras combinaciones de resultados positivos y negativos no encontrados en estas tablas, tienen muy baja probabilidad de que se presenten. Si los resultados no están incluidos en las tablas, se deberá repetir la prueba a partir de la muestra original. Si no es posible, el NMP se puede obtener aplicando una ecuación (véase punto 9.2) para tener el NMP aproximado (para las combinaciones de 3 y 5 tubos).

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

Cuando se preparan más de 3 diluciones de una muestra, el NMP deberá determinarse a partir de los resultados de tres diluciones consecutivas. Primero, para todas las diluciones que tengan todos los tubos positivos, seleccionar la dilución mayor. Después usar las 2 siguientes diluciones mayores (A y B en los ejemplos 1 y 2). Cuando en ninguna de las diluciones probadas hubiera crecimiento en todos los tubos, seleccionar (si es posible) las primeras tres diluciones consecutivas para que la dilución media contenga resultados positivos (C de los ejemplos 1 y 2). Cuando se presenta un resultado positivo en la dilución mas alta no seleccionada, (menor cantidad de muestra), sumar el número de tubos positivos a la dilución mas alta seleccionada (D de los ejemplos 1 y 2). Cuando todos los tubos de todas las diluciones son positivos seleccionar las tres diluciones mas altas. (E de los ejemplos 1 y 2)

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

Ejemplo	Cantidad de muestra (g o ml) ^a					Valores positivos reportados	NMP estimado/g o ml ^b
	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001		
A	3/3	3/3	2/3	0/3	0/3	3-2-0	930
B	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3	3-2-0	9300
C	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0-1-0	30
D	3/3	3/3	2/3	1/3	1/3	3-2-2	2100
E	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3-3-3	>110000

^a Numerador/denominador = número de tubos positivos/número de tubos inoculados.

^b Multiplicar todos los valores de NMP/g (ml) por 100 para expresarlos como NMP/100 g (ml).

Ejemplo 2 para determinar el NMP estimado en series de 5 tubos con 1 g (ml) de muestra por tubo.

Ejemplo	Cantidad de muestra (g o ml) ^a					Valores positivos reportados	NMP estimado/g o ml ^b
	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001		
A	5/5	5/5	2/5	0/5	0/5	5-2-0	490
B	5/5	5/5	5/5	2/5	0/5	5-2-0	4900
C	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0-1-0	18
D	5/5	5/5	3/5	1/5	1/5	5-3-2	1400
E	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5-5-5	>160000

^a Numerador/denominador = número de tubos positivos/número de tubos inoculados.

^b Multiplicar todos los valores de NMP/g (ml) por 100 para expresarlos como NMP/100 g (ml).

Con frecuencia es necesario calcular el NMP con cantidades de muestra diferentes de los enlistados en las tablas 1 y 2 y 5 a 7, desde el primer número de la combinación encontrada. Si la cantidad de muestra es mayor que 0,01 g multiplicar el NMP enlistado en la tabla por 10. El resultado de una determinación de 5 tubos que dé 3 tubos positivos en 0,01 g; 2 tubos positivos en 0,001 g y 1 tubo positivo en 0,0001 g (3 - 2 - 1) leer en la tabla No. 6 como 17 y multiplicar por 10 para así obtener 170 como el NMP final por gramo de muestra. De igual forma si la cantidad más grande utilizada para la tabla de referencia es 1 g en lugar de 0,1 g, dividir el NMP derivado de la tabla entre 10. Por ejemplo el resultado de la determinación del NMP en 3 tubos para *Salmonella spp* que dé 3 tubos positivos en 1 g; 1 tubo positivo en 0,1 g y ningún positivo en 0,01 g (3 - 1 - 0) leer en la tabla No. 1 como 43 y dividir entre 10, lo que da 4,3 como el NMP presuntivo por gramo de muestra.

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

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

Para calcular el NMP/100 g multiplicar por 100.

NOTA: Para uso práctico, utilizar las tablas No. 1 y 2 que contienen mayor número de combinaciones.

Tabla No. 1 Número más probable (NMP) para 1g de muestra cuando se usan 3 tubos con porciones de 0,1; 0,01 y 0,001g

<u>Tubos Positivos</u>															
0,1	0,01	0,001	NMP												
0	0	0	<3	1	0	0	3,6	2	0	0	9,1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7,2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7,3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6,1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9,2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6,2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9,3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9,4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	>1100

Referencia: Official Methods of Analysis of AOAC Internacional, 18 ed. 2005. Chapter 17.3, pag. 5

Tabla No. 2 Número más probable (NMP) para 100 ml de muestra cuando se usan 5 porciones en cada una de 3 diluciones con series geométricas.

No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos			
10	1	0,1		10	1	0,1		10	1	0,1		10	1	0,1		10	1	0,1		10	1	0,1	
ml	ml	ml	NMP	ml	ml	ml	NMP	ml	ml	ml	NMP	ml	ml	ml	NMP	ml	ml	ml	NMP	ml	ml	ml	NMP
0	0	0	<1,8	1	0	0	2	2	0	0	4,5	3	0	0	7,8	4	0	0	13	5	0	0	23
0	0	1	1,8	1	0	1	4	2	0	1	6,8	3	0	1	11	4	0	1	17	5	0	1	31
0	0	2	3,6	1	0	2	6	2	0	2	9,1	3	0	2	13	4	0	2	21	5	0	2	43
0	0	3	5,4	1	0	3	8	2	0	3	12	3	0	3	16	4	0	3	25	5	0	3	58
0	0	4	7,2	1	0	4	10	2	0	4	14	3	0	4	20	4	0	4	30	5	0	4	76
0	0	5	9,0	1	0	5	12	2	0	5	16	3	0	5	23	4	0	5	36	5	0	5	95
0	1	0	1,8	1	1	0	4	2	1	0	6,8	3	1	0	11	4	1	0	17	5	1	0	33
0	1	1	3,6	1	1	1	6,1	2	1	1	9,2	3	1	1	14	4	1	1	21	5	1	1	46
0	1	2	5,5	1	1	2	8,1	2	1	2	12	3	1	2	17	4	1	2	26	5	1	2	64
0	1	3	7,3	1	1	3	10	2	1	3	14	3	1	3	20	4	1	3	31	5	1	3	84
0	1	4	9,1	1	1	4	12	2	1	4	17	3	1	4	23	4	1	4	35	5	1	4	110
0	1	5	11	1	1	5	14	2	1	5	19	3	1	5	27	4	1	5	42	5	1	5	130
0	2	0	3,7	1	2	0	6,1	2	2	0	9,3	3	2	0	14	4	2	0	22	5	2	0	49
0	2	1	5,5	1	2	1	8,2	2	2	1	12	3	2	1	17	4	2	1	26	5	2	1	70
0	2	2	7,4	1	2	2	10	2	2	2	14	3	2	2	20	4	2	2	32	5	2	2	95
0	2	3	9,2	1	2	3	12	2	2	3	17	3	2	3	24	4	2	3	38	5	2	3	120
0	2	4	11	1	2	4	15	2	2	4	19	3	2	4	27	4	2	4	44	5	2	4	150
0	2	5	13	1	2	5	17	2	2	5	22	3	2	5	31	4	2	5	50	5	2	5	180
0	3	0	5,6	1	3	0	8,3	2	3	0	12	3	3	0	17	4	3	0	27	5	3	0	79
0	3	1	7,4	1	3	1	10	2	3	1	14	3	3	1	21	4	3	1	33	5	3	1	110
0	3	2	9,3	1	3	2	13	2	3	2	17	3	3	2	24	4	3	2	39	5	3	2	140
0	3	3	11	1	3	3	15	2	3	3	20	3	3	3	28	4	3	3	45	5	3	3	180
0	3	4	13	1	3	4	17	2	3	4	22	3	3	4	31	4	3	4	52	5	3	4	210
0	3	5	15	1	3	5	19	2	3	5	25	3	3	5	35	4	3	5	59	5	3	5	250
0	4	0	7,5	1	4	0	11	2	4	0	15	3	4	0	21	4	4	0	34	5	4	0	130
0	4	1	9,4	1	4	1	13	2	4	1	17	3	4	1	24	4	4	1	40	5	4	1	170
0	4	2	11	1	4	2	15	2	4	2	20	3	4	2	28	4	4	2	47	5	4	2	220
0	4	3	13	1	4	3	17	2	4	3	23	3	4	3	32	4	4	3	54	5	4	3	280
0	4	4	15	1	4	4	19	2	4	4	25	3	4	4	36	4	4	4	62	5	4	4	350
0	4	5	17	1	4	5	22	2	4	5	28	3	4	5	40	4	4	5	69	5	4	5	430
0	5	0	9,4	1	5	0	13	2	5	0	17	3	5	0	25	4	5	0	41	5	5	0	240
0	5	1	11	1	5	1	15	2	5	1	20	3	5	1	29	4	5	1	48	5	5	1	350
0	5	2	13	1	5	2	17	2	5	2	23	3	5	2	32	4	5	2	56	5	5	2	540
0	5	3	15	1	5	3	19	2	5	3	26	3	5	3	37	4	5	3	64	5	5	3	920
0	5	4	17	1	5	4	22	2	5	4	29	3	5	4	41	4	5	4	72	5	5	4	1600
0	5	5	19	1	5	5	24	2	5	5	32	3	5	5	45	4	5	5	81	5	5	5	>1600

Referencia: Official Methods of Analysis of AOAC Internacional, 18 ed. 2005. Chapter 17.3, pag. 40

Tabla 3. Número mas probable 100 ml de muestra de agua o hielo e intervalos de confianza del 95%, utilizando 5 tubos con 20 ml de muestra

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

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

Tabla 4. Número mas probable por gramo de muestra e intervalos de confianza del 95 %, utilizando 10 tubos con 10 ml de muestra			
No. de tubos positivos	NMP/100ml	Límite de confianza	
		Inferior	Superior
0	<1,1	-	3,3
1	1,1	,05	5,9
2	2,2	,37	8,1
3	3,6	,91	9,7
4	5,1	1,6	13
5	,9	2,5	15
6	9,2	3,3	19
7	12	4,8	24
8	16	5,9	33
9	23	8.1	53
10	>23	12	-

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

Tabla 5. Número mas probable por gramo de muestra e intervalos de confianza del 95 %, utilizando 3 tubos con 0,1; 0,01 y 0,001 g de muestra.

No. de tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza	
0,10	0,01	0,001		Inferior	Superior	0,10	0,01	0,001		Inferior	Superior
0	0	0	<3,0	--	9,5	2	2	0	21	4,5	42
0	0	1	3,0	0,15	9,6	2	2	1	28	8,7	94
0	1	0	3,0	0,15	11	2	2	2	35	8,7	94
0	1	1	6,1	1,2	18	2	3	0	29	8,7	94
0	2	0	6,2	1,2	18	2	3	1	36	8,7	94
0	3	0	9,4	3,6	38	3	0	0	23	4,6	94
1	0	0	3,6	0,17	18	3	0	1	38	8,7	110
1	0	1	7,2	1,3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3,6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7,4	1,3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3,6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3,6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4,5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4,5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9,2	1,4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3,6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4,5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3,7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4,5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8,7	94	3	3	3	>1100	420	--

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

Tabla 6. Número más probable por gramo de muestra e intervalos de confianza del 95 %, utilizando 5 tubos con 0,1; 0,01 y 0,001 g de muestra.

No. Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza		No. Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza.	
0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior	0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior
0	0	0	<1,8	--	6,8	4	0	2	21	6,8	40
0	0	1	1,8	0,09	6,8	4	0	3	25	9,8	70
0	1	0	1,8	0,09	6,9	4	1	0	17	6	40
0	1	1	3,6	0,7	10	4	1	1	21	6,8	42
0	2	0	3,7	0,7	10	4	1	2	26	9,8	70
0	2	1	5,5	1,8	15	4	1	3	31	10	70
0	3	0	5,6	1,8	15	4	2	0	22	6,8	50
1	0	0	2	0,1	10	4	2	1	26	9,8	70
1	0	1	4	0,7	10	4	2	2	32	10	70
1	0	2	6	1,8	15	4	2	3	38	14	100
1	1	0	4	0,7	12	4	3	0	27	9,9	70
1	1	1	6,1	1,8	15	4	3	1	33	10	70
1	1	2	8,1	3,4	22	4	3	2	39	14	100
1	2	0	6,1	1,8	15	4	4	0	34	14	100
1	2	1	8,2	3,4	22	4	4	1	40	14	100
1	3	0	8,3	3,4	22	4	4	2	47	15	120
1	3	1	10	3,5	22	4	5	0	41	14	100
1	4	0	11	3,5	22	4	5	1	48	15	120
2	0	0	4,5	0,79	15	5	0	0	23	6,8	70
2	0	1	6,8	1,8	15	5	0	1	31	10	70
2	0	2	9,1	3,4	22	5	0	2	43	14	100
2	1	0	6,8	1,8	17	5	0	3	58	22	150
2	1	1	9,2	3,4	22	5	1	0	33	10	100
2	1	2	12	4,1	26	5	1	1	46	14	120
2	2	0	9,3	3,4	22	5	1	2	63	22	150
2	2	1	12	4,1	26	5	1	3	84	34	220
2	2	2	14	5,9	36	5	2	0	49	15	150
2	3	0	12	4,1	26	5	2	1	70	22	170
2	3	1	14	5,9	36	5	2	2	94	34	230
2	4	0	15	5,9	36	5	2	3	120	36	250
3	0	0	7,8	2,1	22	5	2	4	150	58	400
3	0	1	11	3,5	23	5	3	0	79	22	220
3	0	2	13	5,6	35	5	3	1	110	34	250

Tabla 6. Número más probable por gramo de muestra e intervalos de confianza del 95 %, utilizando 5 tubos con 0,1; 0,01 y 0,001 g de muestra.

No. Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza		No. Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza.	
0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior	0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior
3	1	0	11	3,5	26	5	3	2	140	52	400
3	1	1	14	5,6	36	5	3	3	180	70	400
3	1	2	17	6	36	5	3	4	210	70	400
3	2	0	14	5,7	36	5	4	0	130	36	400
3	2	1	17	6,8	40	5	4	1	170	58	400
3	2	2	20	6,8	40	5	4	2	220	70	440
3	3	0	17	6,8	40	5	4	3	280	100	710
3	3	1	21	6,8	40	5	4	4	350	100	710
3	3	2	24	9,8	70	5	4	5	430	150	1,100
3	4	0	21	6,8	40	5	5	0	240	70	710
3	4	1	24	9,8	70	5	5	1	350	100	1100
3	5	0	25	9,8	70	5	5	2	540	150	1700
4	0	0	13	4,1	35	5	5	3	920	220	2600
4	0	1	17	5,9	36	5	5	4	1600	400	4600
						5	5	5	>1600	700	--

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

Tabla 7. Número más probable por gramo de muestra e intervalos de confianza del 95 %, utilizando 10 tubos con 0,1; 0,01 y 0,001 g de muestra.

No. Tubos Positivos			NMP/g	Límite de confianza		No. tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza	
0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior	0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior
0	0	0	<,90	--	3,1	8	2	0	17	7,7	34
0	0	1	0,9	0,04	3,1	8	2	1	19	9	34
0	0	2	1,8	0,33	5,1	8	2	2	21	10	39
0	1	0	0,9	0,04	3,6	8	2	3	23	11	44
0	1	1	1,8	0,33	5,1	8	3	0	19	9	34
0	2	0	1,8	0,33	5,1	8	3	1	21	10	39
0	2	1	2,7	0,8	7,2	8	3	2	24	11	44
0	3	0	2,7	0,8	7,2	8	3	3	26	12	50
1	0	0	0,94	0,05	5,1	8	4	0	22	10	39
1	0	1	1,9	0,33	5,1	8	4	1	24	11	44
1	0	2	2,8	0,8	7,2	8	4	2	26	12	50
1	1	0	1,9	0,33	5,7	8	4	3	29	14	58
1	1	1	2,9	0,8	7,2	8	5	0	24	11	44
1	1	2	3,8	1,4	9	8	5	1	27	12	50
1	2	0	2,9	0,8	7,2	8	5	2	29	14	58
1	2	1	3,8	1,4	9	8	5	3	32	15	62
1	3	0	3,8	1,4	9	8	6	0	27	12	50
1	3	1	4,8	2,1	11	8	6	1	30	14	58
1	4	0	4,8	2,1	11	8	6	2	33	15	62
2	0	0	2	0,37	7,2	8	7	0	30	14	58
2	0	1	3	0,81	7,3	8	7	1	33	17	73
2	0	2	4	1,4	9	8	7	2	36	17	74
2	1	0	3	0,82	7,8	8	8	0	34	17	73
2	1	1	4	1,4	9	8	8	1	37	17	74
2	1	2	5	2,1	11	9	0	0	17	7,5	31
2	2	0	4	1,4	9,1	9	0	1	19	9	34
2	2	1	5	2,1	11	9	0	2	22	10	39
2	2	2	6,1	3	14	9	0	3	24	11	44
2	3	0	5,1	2,1	11	9	1	0	19	9	39
2	3	1	6,1	3	14	9	1	1	22	10	40
2	4	0	6,1	3	14	9	1	2	25	11	44
2	4	1	7,2	3,1	15	9	1	3	28	14	58
2	5	0	7,2	3,1	15	9	1	4	31	14	58

Tabla 7. Número más probable por gramo de muestra e intervalos de confianza del 95 %, utilizando 10 tubos con 0,1; 0,01 y 0,001 g de muestra.

No. Tubos Positivos			NMP/g	Límite de confianza		No. tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza	
0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior	0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior
3	0	0	3,2	0,9	9	9	2	0	22	10	44
3	0	1	4,2	1,4	9,1	9	2	1	25	11	46
3	0	2	5,3	2,1	11	9	2	2	28	14	58
3	1	0	4,2	1,4	10	9	2	3	32	14	58
3	1	1	5,3	2,1	11	9	2	4	35	17	73
3	1	2	6,4	3	14	9	3	0	25	12	50
3	2	0	5,3	2,1	12	9	3	1	29	14	58
3	2	1	6,4	3	14	9	3	2	32	15	62
3	2	2	7,5	3,1	15	9	3	3	36	17	74
3	3	0	6,5	3	14	9	3	4	40	20	91
3	3	1	7,6	3,1	15	9	4	0	29	14	58
3	3	2	8,7	3,6	17	9	4	1	33	15	62
3	4	0	7,6	3,1	15	9	4	2	37	17	74
3	4	1	8,7	3,6	17	9	4	3	41	20	91
3	5	0	8,8	3,6	17	9	4	4	45	20	91
4	0	0	4,5	1,6	11	9	5	0	33	17	73
4	0	1	5,6	2,2	12	9	5	1	37	17	74
4	0	2	6,8	3	14	9	5	2	42	20	91
4	1	0	5,6	2,2	12	9	5	3	46	20	91
4	1	1	6,8	3	14	9	5	4	51	25	120
4	1	2	8	3,6	17	9	6	0	38	17	74
4	2	0	6,8	3	15	9	6	1	43	20	91
4	2	1	8	3,6	17	9	6	2	47	21	100
4	2	2	9,2	3,7	17	9	6	3	53	25	120
4	3	0	8,1	3,6	17	9	7	0	44	20	91
4	3	1	9,3	4,5	18	9	7	1	49	21	100
4	3	2	10	5	20	9	7	2	54	25	120
4	4	0	9,3	4,5	18	9	7	3	60	26	120
4	4	1	11	5	20	9	8	0	50	25	120
4	5	0	11	5	20	9	8	1	55	25	120
4	5	1	12	5,6	22	9	8	2	61	26	120
4	6	0	12	5,6	22	9	8	3	68	30	140
5	0	0	6	2,5	14	9	9	0	57	25	120
5	0	1	7,2	3,1	15	9	9	1	63	30	140

Tabla 7. Número más probable por gramo de muestra e intervalos de confianza del 95 %, utilizando 10 tubos con 0,1; 0,01 y 0,001 g de muestra.

No. Tubos Positivos			NMP/g	Límite de confianza		No. tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza	
0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior	0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior
5	0	2	8,5	3,6	17	9	9	2	70	30	140
5	0	3	9,8	4,5	18	10	0	0	23	11	44
5	1	0	7,3	3,1	15	10	0	1	27	12	50
5	1	1	8,5	3,6	17	10	0	2	31	14	58
5	1	2	9,8	4,5	18	10	0	3	37	17	73
5	1	3	11	5	21	10	1	0	27	12	57
5	2	0	8,6	3,6	17	10	1	1	32	14	61
5	2	1	9,9	4,5	18	10	1	2	38	17	74
5	2	2	11	5	21	10	1	3	44	20	91
5	3	0	10	4,5	18	10	1	4	52	25	120
5	3	1	11	5	21	10	2	0	33	15	73
5	3	2	13	5,6	23	10	2	1	39	17	79
5	4	0	11	5	21	10	2	2	46	20	91
5	4	1	13	5,6	23	10	2	3	54	25	120
5	4	2	14	7	26	10	2	4	63	30	140
5	5	0	13	6,3	25	10	3	0	40	17	91
5	5	1	14	7	26	10	3	1	47	20	100
5	6	0	14	7	26	10	3	2	56	25	120
6	0	0	7,8	3,1	17	10	3	3	66	30	140
6	0	1	9,2	3,6	17	10	3	4	77	34	150
6	0	2	11	5	20	10	3	5	89	39	180
6	0	3	12	5,6	22	10	4	0	49	21	120
6	1	0	9,2	3,7	18	10	4	1	59	25	120
6	1	1	11	5	21	10	4	2	70	30	150
6	1	2	12	5,6	22	10	4	3	82	38	180
6	1	3	14	7	26	10	4	4	94	44	180
6	2	0	11	5	21	10	4	5	110	50	210
6	2	1	12	5,6	22	10	5	0	62	26	140
6	2	2	14	7	26	10	5	1	74	30	150
6	2	3	15	7,4	30	10	5	2	87	38	180
6	3	0	12	5,6	23	10	5	3	100	44	180
6	3	1	14	7	26	10	5	4	110	50	210
6	3	2	15	7,4	30	10	5	5	130	57	220
6	4	0	14	7	26	10	5	6	140	70	280

Tabla 7. Número más probable por gramo de muestra e intervalos de confianza del 95 %, utilizando 10 tubos con 0,1; 0,01 y 0,001 g de muestra.

No. Tubos Positivos			NMP/g	Límite de confianza		No. tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza	
0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior	0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior
6	4	1	15	7,4	30	10	6	0	79	34	180
6	4	2	17	9	34	10	6	1	94	39	180
6	5	0	16	7,4	30	10	6	2	110	50	210
6	5	1	17	9	34	10	6	3	120	57	220
6	5	2	19	9	34	10	6	4	140	70	280
6	6	0	17	9	34	10	6	5	160	74	280
6	6	1	19	9	34	10	6	6	180	91	350
6	7	0	19	9	34	10	7	0	100	44	210
7	0	0	10	4,5	20	10	7	1	120	50	220
7	0	1	12	5	21	10	7	2	140	61	280
7	0	2	13	6,3	25	10	7	3	150	73	280
7	0	3	15	7,2	28	10	7	4	170	91	350
7	1	0	12	5	22	10	7	5	190	91	350
7	1	1	13	6,3	25	10	7	6	220	100	380
7	1	2	15	7,2	28	10	7	7	240	110	480
7	1	3	17	7,7	31	10	8	0	130	60	250
7	2	0	13	6,4	26	10	8	1	150	70	280
7	2	1	15	7,2	28	10	8	2	170	80	350
7	2	2	17	7,7	31	10	8	3	200	90	350
7	2	3	19	9	34	10	8	4	220	100	380
7	3	0	15	7,2	30	10	8	5	250	120	480
7	3	1	17	9	34	10	8	6	280	120	480
7	3	2	19	9	34	10	8	7	310	150	620
7	3	3	21	10	39	10	8	8	350	150	620
7	4	0	17	9	34	10	9	0	170	74	310
7	4	1	19	9	34	10	9	1	200	91	380
7	4	2	21	10	39	10	9	2	230	100	480
7	4	3	23	11	44	10	9	3	260	120	480
7	5	0	19	9	34	10	9	4	300	140	620
7	5	1	21	10	39	10	9	5	350	150	630
7	5	2	23	11	44	10	9	6	400	180	820
7	6	0	21	10	39	10	9	7	460	210	970
7	6	1	23	11	44	10	9	8	530	210	970
7	6	2	25	12	46	10	9	9	610	280	1300

Tabla 7. Número más probable por gramo de muestra e intervalos de confianza del 95 %, utilizando 10 tubos con 0,1; 0,01 y 0,001 g de muestra.

No. Tubos Positivos			NMP/g	Límite de confianza		No. tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza	
0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior	0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior
7	7	0	23	11	44	10	10	0	240	110	480
7	7	1	26	12	50	10	10	1	290	120	620
8	0	0	13	5,6	25	10	10	2	350	150	820
8	0	1	15	7	26	10	10	3	430	180	970
8	0	2	17	7,5	30	10	10	4	540	210	1300
8	0	3	19	9	34	10	10	5	700	280	1500
8	1	0	15	7,1	28	10	10	6	920	350	1900
8	1	1	17	7,7	31	10	10	7	1200	480	2400
8	1	2	19	9	34	10	10	8	1600	620	3400
8	1	3	21	10	39	10	10	9	2300	810	5300
						10	10	10	>2300	1300	--

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

Tabla No. 8 Número más probable (NMP) por 100 ml de muestra inoculando tubos de cada una de tres diluciones geométricas

Tubos Positivos															
10 ml	1 ml	0,1 ml	NMP	10 ml	1 ml	0,1 ml	NMP	10 ml	1 ml	0,1 ml	NMP	10 ml	1 ml	0,1 ml	NMP
0	0	0	< 3	1	0	0	3,6	2	0	0	9,1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7,2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7,3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6,1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9,2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6,2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9,3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9,4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	>1100

Referencia: Recommended Procedures for the Examination of Sea Water and Shellfish. Fourth Edition 1970. APHA. New York.

CÁLCULO APROXIMADO DEL NMP Y 95% DE LÍMITE DE CONFIANZA

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

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

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

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

MUESTRA (g)	No. DE TUBOS	No. DE TUBOS POSITIVOS
8	5	5
4	5	4
2	5	2
1	5	0
0,5	5	1
0,25	5	0

El número de tubos positivos es:

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

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

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

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

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

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

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

Donde: a es el radio de dilución 2 y

n es el número de tubos por dilución.

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

$$\log 0,32 \pm (1,078)[(\log a)/n]^{1/2}$$

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

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

11. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Expresar en NMP/g o ml para alimentos, NMP/100g 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 mas bajo del NMP de la tabla utilizada, excepto en los casos de agua para uso y consumo humano que por acuerdo internacional se informa como "No detectable" o "ND"

12. MEDIDAS DE SEGURIDAD

- Usar bata de laboratorio.
- Lavarse las manos antes y después del análisis.
- Utilizar lentes de protección cuando se incida la luz ultravioleta sobre los tubos.
- Descontaminar el material después de su uso de acuerdo a los procedimientos correspondientes.

13. MEDIDAS DE CONTROL DE CALIDAD

- 13.1 Verificar la funcionalidad del procedimiento analítico mediante cultivos control con cepas de *E. coli* y *E. aerogens* para coliformes fecales y *E. coli* y *K. pneumoniae* para la determinación de *E. coli* con caldo EC-MUG.
- 13.2 Cuando el ingreso de muestras para esta determinación sea frecuente, analizar un duplicado cada mes; si el ingreso no es frecuente, realizar un duplicado cada 10 muestras.
- 13.3 Registrar las temperaturas de incubación con termómetros verificados
- 13.4 Pesar la muestra en balanza calibrada y verificada.
- 13.5 Verificar el ciclo de esterilización de autoclaves con indicador biológico y termómetro de máximas calibrado o verificado.
- 13.6 Verificar el ciclo de esterilización de hornos con indicador biológico.
- 13.7 Realizar control de medios de cultivo con cepas tipo (evaluación biológica) y evaluación física.
- 13.8 Realizar control ambiental por el método de sedimentación.

14. VALIDEZ DE LA PRUEBA

Si el crecimiento de los controles no es característico la prueba se invalida
Cuando todos los tubos de la menor dilución sean positivos y todos los tubos de la dilución mayor sean negativos o la combinación de ambos.

15. BIBLIOGRAFÍA

- 15.1 Bacteriological Analytical Manual, (version en línea, Sep. 2011), Chapter 4, Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria, 2002. Peter Feng, Stephen D. Weagant, Michael A. Grant.
- 15.2 American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th edition 2001. Washington DC.
- 15.3 American Public Health Association. Recommended Procedures for the Examination of Seawater and shellfish. 4th edition 1970. Washington DC
- 15.4 American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 16th edition 1992. Washington DC
- 15.5 American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th edition 1998. Washington DC.
- 15.6 Food and Agriculture Organization of the United Nations. Manual of Food Quality Control. 4.Rev.1. Microbiological Analysis. 1992.
- 15.7 AOAC Official Methods of Analysis (1995). Microbiological Methods. Capítulo 17.
- 15.8 Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. MacFadin. Editorial Panamericana Ed. 2002.
- 15.9 American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21th edition 2005. Washington DC

COMISIÓN DE CONTROL ANALÍTICO Y AMPLIACIÓN DE COBERTURA		 SALUD SECRETARÍA DE SALUD
CONTROL DE CAMBIOS DE DOCUMENTOS DEL SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD		
Revisión No: 8 Fecha de emisión: 2011-11-25	MÉTODO DE PRUEBA PARA LA ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD MICROBIANA POR LA TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP), DETECCIÓN DE COLIFORMES TOTALES, COLIFORMES FECALES Y <i>Escherichia coli</i>	
		CLAVE: CCAYAC-M-004

FECHA: 2009-08-28		REVISIÓN: 7	CLAVE: CCAYAC-M-004
PÁGINA	NUMERAL O PÁRRAFO	CAMBIOS:	
1	1	De: Establecer la metodología para la estimación de la densidad de bacterias por la técnica del número más probable presentes en muestras de alimentos y específicamente de coliformes totales, coliformes fecales y <i>Escherichia coli</i> . A: Establecer la metodología para la estimación de la densidad de Coliformes Totales, Coliformes Fecales y <i>Escherichia coli</i> por la técnica del número más probable presentes en muestras de alimentos y agua.	
1	2	Este método es aplicable a cualquier grupo bacteriano de interés sanitario, para la detección de coliformes totales, coliformes fecales y <i>Escherichia coli</i> , especialmente en productos que se encuentran en bajas concentraciones de microorganismos (< 10 ⁶ UFC/g o ml) Ejemplo: Leche, agua, y para aquellos alimentos cuyas características particulares puedan interferir en la exactitud de la cuenta de <u>Unidades Formadoras de Colonias (UFC)</u> .	
1	3	Se modifica la redacción de todo el numeral, incluyendo introducción y fundamento general de método de detección de coliformes totales, fecales y E. coli.	
2	4	Balanza con no menor <u>capacidad adecuada</u> y sensibilidad de 0,1 g	
2	5	Se eliminan los asterisco de Espátulas, Cucharas, Cuchillos, Pinzas	
10	8	Decía: condiciones ambientales Dice: Condiciones de prueba	
10	9	Se modifica la estructura del documento pasando "ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD MICROBIANA POR LA TÉCNICA DE NMP Y CÁLCULO APROXIMADO DEL NMP Y 95% DE LÍMITE DE CONFIANZA" al numeral 10 correspondiente a cálculos, con lo que cambia la numeración de todo el numeral 9	
11	9.1 B1	De cada tubo que muestre formación de gas, tomar una asada y sembrar en un número igual de tubos con el medio indicado para la prueba confirmativa; para bacterias coliformes totales, utilizar el caldo verde brillante lactosa bilis y para coliformes fecales utilizar caldo EC. Alternativamente se pueden utilizar aplicadores de madera estériles a 2.5 cm de profundidad. Inocular en tubos de caldo EC un control positivo de <i>Escherichia coli</i> y un control negativo de <i>Enterobacter aerogenes</i> e incubar con las muestras.	

