	<b>DETERMINACION DE COLIFORMES EN ALIMENTOS POR EL METODO DE NUMERO MÁS PROBABLE</b>	<b>CÓDIGO</b>	MI-GS-GI-33
		<b>VERSIÓN</b>	0
		<b>FECHA DE APROBACIÓN</b>	21/09/2018
		<b>PAGINA</b>	1 de 6

## 1. OBJETIVO

Determinar el recuento de coliformes totales y fecales por la técnica de número más probable en un alimento

## 2. ALCANCE

Aplicar este procedimiento a todas las muestras de alimentos en las cuales se presume que tienen contaminación microbiana y a las cuales según reglamento sanitario o a petición del interesado se requiere este análisis.

## 3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Los métodos utilizados en la determinación de coliformes totales y coliformes fecales como microorganismos indicadores de la calidad sanitaria de agua o como indicador de las condiciones sanitarias en el procesamiento de alimentos, se basan en la fermentación de la lactosa. El método de número más probable NMP, es un método estadístico, compuesto por una etapa presuntiva y una confirmativa. El ensayo consiste en sembrar diluciones seriadas de la muestra en medios líquidos, basándose en la combinación de tubos positivos se puede estimar el número de microorganismos presentes por gramo de alimento, con el uso de la tabla estadística aportada por la referencia.

### Grupo coliformes:

El grupo coliformes incluye bacilos gram negativos, aeróbios y anaeróbios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa formando ácido y gas dentro de 48 horas. a 35°C. Este grupo incluye a los géneros: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*.


### Grupo coliformes fecales:

Coliformes fecales se definen como bacilos gram negativos aeróbios y anaeróbios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa formando ácido y gas dentro de 24 hrs. a  $45,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  para análisis de alimentos.

## 4. REFERENCIAS

## 5. RESPONSABILIDADES

Sera responsabilidad del profesional asignado, como según cronograma de análisis de muestras, verificar que este procedimiento se lleve a cabo según esta consignado en este documento.

	<b>DETERMINACION DE COLIFORMES EN ALIMENTOS POR EL METODO DE NUMERO MÁS PROBABLE</b>	<b>CÓDIGO</b>	MI-GS-GI-33
		<b>VERSIÓN</b>	0
		<b>FECHA DE APROBACIÓN</b>	21/09/2018
		<b>PAGINA</b>	2 de 6

## 6. CONDICIONES PREVIAS

- Toma y almacenamiento adecuado de la muestra
- Preparación y esterilización del material y medios de cultivo requeridos en el procedimiento.

## 7. PROCEDIMIENTO


- Rotulado de los frascos schott con su respectivo número de muestra.
- Mezclar muy bien la muestra para asegurar su homogenización antes de preparar las diluciones.
- Preparar la muestra: macerar, picar, mezclar y pesar 10gr representativos de la muestra total, en el frasco de dilución que contiene 90 ml de agua peptonada 0.1 %, en una balanza previamente tarada, para obtener una dilución  $10^{-1}$ .
- Desinfectar con alcohol al 70% el sitio por donde se vaya a extraer la muestra.
- Abrir aséptica y adecuadamente la muestra.
- Volver a homogenizar la muestra una vez pesada, dejar en reposo 10 minutos.
- Preparar diluciones consecutivas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-n}$ , etc.) según el criterio.
- Preparar la dilución  $10^{-1}$  de muestras líquidas, tomando 1ml de la muestra del frasco de dilución que contiene 90 ml de agua peptonada y 10 gr de la muestra.
- Preparar la dilución  $10^{-2}$ , transfiriendo 1ml de la dilución  $10^{-1}$ , con micropipeta de 1000µl a un tubo de dilución que contenga 9 ml de agua peptonada 0.1%, agitar cuidadosamente.
- Preparar la dilución  $10^{-3}$ , transfiriendo 1ml de la dilución  $10^{-2}$ , con micropipeta de 1000 µl a un tubo de dilución que contenga 9ml de agua peptonada 0.1%, agitar cuidadosamente
- Repetir estos pasos hasta obtener la dilución necesarias. Cada dilución sucesiva disminuirá 10 veces la concentración.

## 8. MATERIALES Y EQUIPOS

- Lo necesario para la preparación y dilución de los homogenizados de alimentos
- Incubadora a  $35^{\circ}\text{C} + / - 2^{\circ}\text{C}$
- Pipetas bacteriológicas de 1ml estériles
- Asa de inoculación
- Gradillas
- Cajas de Petri
- Tubos tapa rosca de 150 x 180mm
- Tubos de fermentación Durham

## 9. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

- Caldo lactosado bilis verde brillante al 2%
- Agar eosina azul de metileno según Levine E.M.B
- Agar Endo

	<b>DETERMINACION DE COLIFORMES EN ALIMENTOS POR EL METODO DE NUMERO MÁS PROBABLE</b>	<b>CÓDIGO</b>	MI-GS-GI-33
		<b>VERSIÓN</b>	0
		<b>FECHA DE APROBACIÓN</b>	21/09/2018
		<b>PAGINA</b>	3 de 6

- Agar violeta cristal rojo neutro bilis (V.R.B.A)

## 10. PATRONES Y MATERIALES DE REFERENCIA

Cepas de referencia:

- Control positivo: cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922
- Control negativo: cepa de *Staphylococcus aureus*. ATCC 6538

## 11. CONDICIONES AMBIENTALES

La muestra se debe analizar en cuarto de siembra y cabina de bioseguridad.

## 12. PREPARACION DE LA MUESTRA

Preparar las muestras y las diluciones de los homogenizados tal como se ha recomendado


## 13. DESCRIPCION DEL PROCEDIMIENTO

### Prueba Presuntiva

- Pipetear 1ml de cada una de las diluciones del homogenizado del alimento en tubos con caldo lactosado bilis verde brillante al 2%, utilizando tres tubos por cada dilución.
- Agitar suavemente los tubos e incubarlos a 35°C + / - 2°C por 24 – 48 horas.
- Pasadas las 48 horas, anotar los tubos que muestren producción de gas, que se observa por el desplazamiento del medio en el tubo de Durham. Si a las 24 horas todos los tubos muestran producción de gas, continuar con la prueba confirmativa.

### Prueba Confirmativa

- Confirmar que los tubos con producción de gas en el caldo lactosado bilis verde brillante al 2% de la prueba presuntiva, son positivos a organismos del grupo coliforme, sembrado por estría una asada de cada uno de los tubos en la superficie de una placa de Agar eosina azul de metileno (EMB), Agar violeta rojo neutro bilis (VRBA), o Agar Endo
- Incubar las placas invertidas a 35°C + / - 2°C por 24 horas
- Pasado este tiempo se hace la lectura de las colonias típicas de coliformes
- Anotar el número de tubos confirmados como positivos para organismos coliformes
- Para obtener el NMP, proceder de la siguiente manera:
- Ver en cada una de las tres diluciones seleccionadas el número de tubos en los en los que se confirmó la presencia de coliformes.

	<b>DETERMINACION DE COLIFORMES EN ALIMENTOS POR EL METODO DE NUMERO MÁS PROBABLE</b>	<b>CÓDIGO</b>	MI-GS-GI-33
		<b>VERSIÓN</b>	0
		<b>FECHA DE APROBACIÓN</b>	21/09/2018
		<b>PAGINA</b>	4 de 6

#### 14. ASEGURAMIENTO DE CALIDAD DEL METODO

Los ensayos se realizarán de acuerdo con el procedimiento de aseguramiento de la calidad de Técnicas y Medios de Cultivo, y a través del FORMATO DE CALIDAD.

#### 15. EXPRESIONES DE RESULTADOS

- Se informará el resultado del Análisis en el formato de DATOS PRIMARIOS Y FORMATO DE RESULTADOS DE ALIMENTOS
- Para calcular el NMP de organismos coliformes por gramo o ml de alimento utilizar la siguiente fórmula.

Ejemplo:

$$\frac{\text{NMP de la tabla} \times \text{Factor de dilución intermedio}}{100} = \text{NMP / gr o ml}$$

Si se obtuvieron los siguientes datos en la prueba confirmativa:


2 tubos positivos en la dilución  $10^{-1}$   
 1 tubo positivo en la dilución  $10^{-2}$   
 1 tubo positivo en la dilución  $10^{-3}$

Tabla NMP 2: 1: 1 = 20

Aplicando la fórmula


$$\frac{20 \times 100}{100} = 20 \text{ coliformes / gr o ml}$$

Expresar los resultados como NMP de coliformes / gr o ml

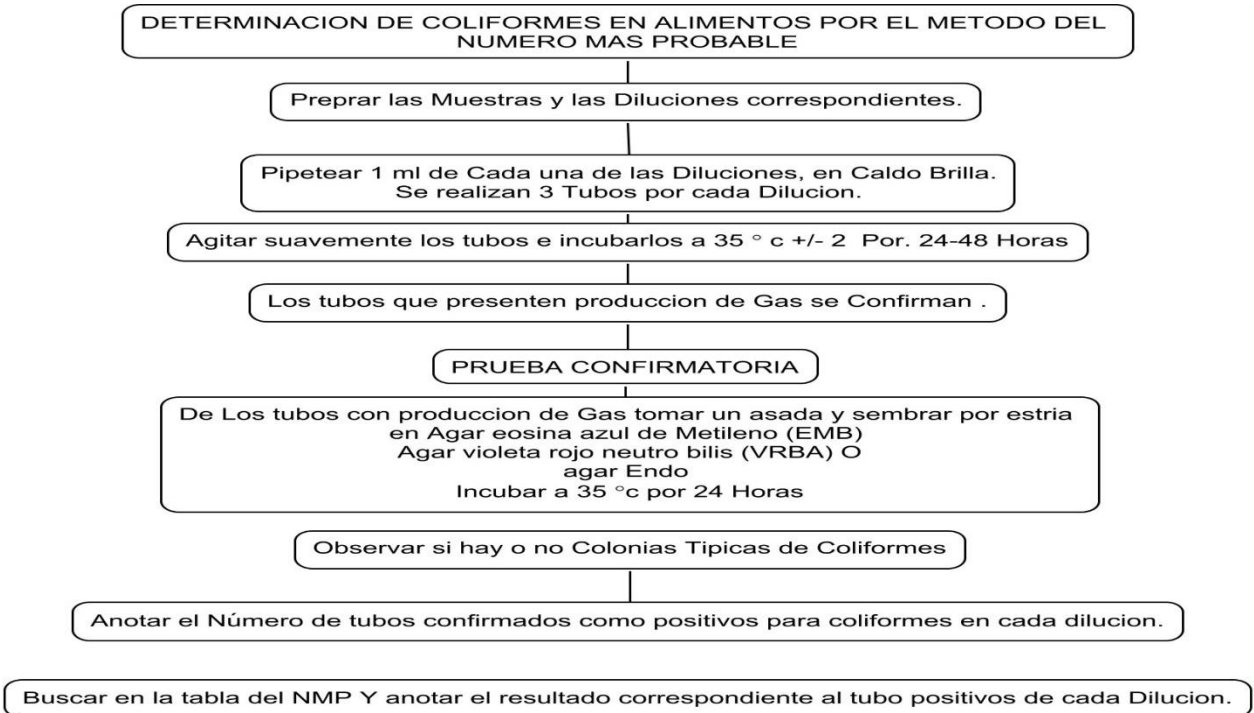
	<b>DETERMINACION DE COLIFORMES EN ALIMENTOS POR EL METODO DE NUMERO MÁS PROBABLE</b>	<b>CÓDIGO</b>	MI-GS-GI-33
		<b>VERSIÓN</b>	0
		<b>FECHA DE APROBACIÓN</b>	21/09/2018
		<b>PAGINA</b>	5 de 6

## 17. ANEXO 14

<b>TABLA NMP PARA ALIMENTOS (Serie de tres tubos)</b>			
<b>Número de tubos positivos</b>			<b>+ NMP por ml o gr</b>
<b>10<sup>0</sup></b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	
0	0	0	<3
0	0	1	3
0	1	0	3
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100
3	3	3	<2400

	<b>DETERMINACION DE COLIFORMES EN ALIMENTOS POR EL METODO DE NUMERO MÁS PROBABLE</b>	<b>CÓDIGO</b>	MI-GS-GI-33
		<b>VERSIÓN</b>	0
		<b>FECHA DE APROBACIÓN</b>	21/09/2018
		<b>PAGINA</b>	6 de 6

## 17.1 ANEXO



CONTROL DE CAMBIOS				
VERSIÓN	FECHA	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO	REVISÓ	APROBÓ
0	19/09/2018	EMISIÓN INICIAL	<b>SANDRA BAYONA VERGEL</b> Coordinador Grupo LSP.  <b>JAVIER OREJARENA PINILLA</b> Director de Salud Integral.	<b>LUIS ALEJANDRO RIVERO OSORIO</b> Secretario de Salud de Santander.