



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA
DEL CENTRO DE VERACRUZ

Reporte Final de Estadía

Galdino Lino Namigtle Oltehua

Desarrollo del procedimiento para el análisis microbiológicos en base a la norma NOM-210-SSA1-2014, Apéndice 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)



Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz

Programa Educativo de Ingeniería en Procesos Bioalimentarios.

Reporte para obtener el título de
Ingeniero en Proceso Bioalimentarios.

Proyecto de estadía a realizarse en el laboratorio de ensayo de alimentos de la
Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz.

Nombre del proyecto

Desarrollo del procedimiento para el análisis microbiológico en base a la NOM-210-SSA1-2014. Apéndice 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).

Presenta

TSU. Galdino Lino Namigtle Oltehua

Cuitláhuac/Maltrata, Ver., a 3° de mayo de 2017

Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz



Programa Educativo
Ingeniería en Procesos Bioalimentarios.

Nombre del Asesor Industrial
MCIBQ. Darney Citlali Martínez Díaz

Nombre del Asesor Académico
MC. En Alim. Olivia Rodríguez Alcalá

Jefe de Carrera
MCIBQ. Darney Citlali Martínez Díaz

Nombre del Alumno
TSU. Galdino Lino Namigtle Oltehua

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por darme cada día de vida y permitirme seguir creciendo y prendiendo de la vida, por dármele en mi línea de vida la posibilidad de encontrar y conocer a muy buenas personas a los cuales tengo mucho que agradecer, por su apoyo y aprecio.

A MIS PADRES

Que siempre me han apoyado, y me han impulsado a seguir adelante, con sus sabios consejos y su muy incondicional amor de padres, gracias a ellos por los valores que me inculcaron para salir y convivir con la sociedad, con respeto, dignidad, responsabilidad y tenacidad.

A MIS PROFESORES

Por su invaluable conocimiento lo cual me ha formado como profesionista, a esos profesores que me motivaron y apoyaron más que como profesores como unos amigos gracias

A MIS AMIGOS

Gracias por estar siempre en las buenas y en las malas, por tantas experiencias compartidas, pero sobre todo por permanecer que al final eso es lo más importante.

“Nuestro legado va más allá de nuestra profesión, más allá de nuestros logros, más allá de nuestros éxitos.

Nuestro legado es la huella que dejamos en las personas, el trato humano que damos, la esperanza e inspiración que proyectamos a los demás que sirve para inspirar a vivir una mejor vida. Nuestro legado se constituye a base de nuestra ética de trabajo, al ser fiel a nosotros mismos, en defender y actuar conforme a nuestros valores.

Nuestro legado no es un premio ni un castigo simplemente es la retribución de lo que hemos dado.

Nuestro legado se puede convertir en una huella imborrable que ayuda a crear un mejor mundo “

RESUMEN

El desarrollo de un procedimiento el cual describe la metodología de análisis microbiológico dentro de un laboratorio acreditado es la primera etapa para la implementación de un método de análisis acreditado, si se emiten normas de actualización sobre procedimientos de identificación y cuantificación del analito de interés o microorganismos los laboratorios están obligados a realizar actualizaciones del método con ello sustituyendo o cancelando la metodología antes establecida

La metodología empleada para desarrollar el proyecto se propuso en 4 etapas:

La primera etapa consistió en realizar un análisis de la NOM-210-SSA1-2014, la segunda etapa se centró en la identificación de formatos y procedimientos establecidos en el laboratorio, la tercera etapa fue realizar una comparación de métodos para evaluar si se sustituía el anterior o simplemente se generaba un nuevo método y por último la cuarta etapa se propuso la estructura final del procedimiento esto para su redacción.

El desarrollo de este procedimiento ayudará a incrementar las técnicas que se desarrollan en el laboratorio de ensayos de la universidad Tecnológica del Centro de Veracruz.

Contenido

AGRADECIMIENTOS.....	1
RESUMEN	2
CAPÍTULO 1.	3
INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Estado del Arte.....	4
1.2 Planteamiento del Problema	5
1.3 Objetivo general.....	5
1.4 Definición de variables	5
1.5 Hipótesis.....	6
1.6 Justificación del Proyecto,.....	6
1.7 Limitaciones y Alcances.....	6
1.8. UTCV.....	6
1.8.1 Misión institucional.....	7
1.8.2 Valores Institucionales.....	7
1.8.3 Política de Calidad.....	8
1.8.4 Laboratorio de análisis de ensayos de la UTCV.....	8
CAPÍTULO 2.	10
METODOLOGÍA.....	10
2.1- Análisis e interpretación de la NOM-210-SSA1-2014.....	10
2.2- Identificación de formato internos establecidos para los procedimientos de análisis microbiológicos.....	10
2.3.-Diseño de la estructura del procedimiento de la determinación densidad de Coliformes totales, fecales y E. Coli por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua.....	10
2.4.-Elaboración de procedimientos y formatos.....	10
CAPÍTULO 3	11

. DESARROLLO DEL PROYECTO	11
3.1- Análisis e interpretación de la NOM-210-SSA1-2014, interpretación de la norma.	11
3.2.- Identificación de formato internos establecidos para los procedimientos de análisis microbiológicos.	11
3.3.-Estructura del procedimiento de la determinación densidad de Coliformes totales, fecales y E. Coli por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua.....	10
3.4.-Elaboración de procedimientos y formatos.....	10
CAPÍTULO 4	12
RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....	12
4.1 Resultados.....	12
4.2.-Conclusiones	14
4.3- Trabajos Futuros y recomendaciones	14
ANEXO 1 Procedimiento para la determinación de coliformes totales, termotolerantes y E. Coli por la técnica del NMP	15
ANEXO 2. _Formato para el reporte de la determinación de coliformes totales, termotolerantes y E. Coli por la técnica del NMP.....	32.
BIBLIOGRAFÍA.....	34

CONTENIDO DE FIGURAS

Tabla 1.	Comparación de estructuras de procedimientos	10
Figura 2.	Estructura de encabezado de documentos	12
Figura 3.	Formato para el reporte de análisis	13

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN

La actualización de la NOM-210-SSA1-2014.-Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos, la cual como objetivo de esta norma es establecer los métodos generales y alternativas de prueba para la determinación de los indicadores microbianos y patógenos en alimentos, bebidas y agua para uso y consumo humano. (salud, 2014). La norma entrada en vigor el día 3 de octubre del 2014 deja sin efecto a la NOM-112-SSA1-1994 la cual el laboratorio de ensayos de la UTCV tiene acreditado como técnica de análisis microbiológica.

Una de las actualizaciones que impactan directamente a los laboratorios que tienen acreditaciones en métodos microbiológicos, es el apéndice 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. La cual sustituye a la NOM-112-SSA1-1994 Determinación de bacterias Coliformes. Técnica del número más probable, esta actualización impacta directamente al laboratorio de ensayos de la UTCV, ya que al ofrecer análisis externos a la industria de la región se tiene que actualizar la metodología de análisis.

Es por esto que el laboratorio de ensayo de alimentos de la UTCV mediante el presente proyecto tiene como objetivo implementar una nueva técnica de análisis microbiológica, con el propósito de poder ofrecer a las industrias técnicas de análisis actualizados y así cumplir con la normativa en vigor y con esto poder seguir dentro del mercado.

Este proyecto tiene como finalidad la implementación de técnicas de análisis de alimentos del laboratorio de ensayo de la Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz, con el fin de implementar en el laboratorio análisis microbiológicos de mayor relevancia en el medio de la industria alimenticia, que además contarán con un tiempo razonable en la obtención de resultados los cuales serán confiables gracias a que se propone como nueva técnica acreditada por la entidad mexicana de acreditación (EMA)

1.1 Estado del Arte.

En los últimos años, la búsqueda de indicadores del grado de contaminación microbiana de una muestra de agua y alimento es uno de los aspectos en que más énfasis se ha hecho en los laboratorios de análisis de agua, aguas residuales y alimentos. Es de vital importancia en la microbiología ambiental contar con un control de la calidad, dentro del cual, debe considerarse el método de ensayo, de modo que se garantice una óptima calidad de los datos resultantes (Martinez Morales , 2006), es por ello que en la actualidad los laboratorios que ofrecen servicio de análisis de ensayos para la identificación de microorganismos indicadores o patógenos tiene que tener cierto sistema de calidad esto para asegurar los resultados que emite el laboratorio y así poder dar soporte y valides a los ensayos emitidos por los laboratorios.

La norma ISO/IEC 17025 constituye la base técnico-metodológica para la acreditación de los laboratorios que realizan análisis microbiológicos. Por la importancia y alcance de esta nueva norma internacional, es necesario un enfoque acerca de su imprescindible asimilación en la economía, teniendo en cuenta que el ensayo y la calibración de los instrumentos de medición son la base objetiva e indispensable en el proceso de evaluación de la conformidad de un servicio. (Martinez Morales , 2006). La importancia de la implementación de esta norma es para asegurar una buena administración de los recursos dentro del laboratorio, así como asegurar un buen sistema de gestión de calidad y así poder asegurar los resultados, emitidos, dando un cierto nivel de confianza al cliente.

Un factor importante para el desarrollo de técnicas microbiológicas en los laboratorio tal como lo menciona (María Luisa Camaró-Salaa, 2013) en el desarrollo y realización de análisis de control microbiológico es una herramienta que tiene una repercusión decisiva en el ámbito del diagnóstico clínico, de la salud pública, de la tecnología alimentaria y del medio ambiente. En los últimos años las actividades relacionadas con la verificación y validación de métodos analíticos han cobrado gran importancia debido por un lado al continuo desarrollo y actualización de técnicas y equipos analíticos cada vez más complejos, y por otro lado al interés de los profesionales en garantizar la calidad de sus procesos y resultados. (María Luisa Camaró-Salaa, 2013).

Los análisis microbiológicos incluyen ensayos de esterilidad, detección, aislamiento, recuento e identificación de microorganismos y sus metabolitos en diferentes materiales y productos de cualquier otro tipo en el que utilicen microorganismos como parte de un sistema de detección. La importancia de la validación o verificación de estos ensayos en los laboratorios hoy en día es para aportar un grado de confianza y una margen de error contemplado por el laboratorio y los analistas que realizan la técnica.

La validación de una técnica es un proceso por el cual se establece mediante estudios de requerimiento la aplicación analítica propuesta, siendo su principal objetivo confirmar y documentar la confiabilidad de los resultados obtenidos. Con ella se determina las posibles variaciones que se presentan entre posibles números de ensayos y de esta manera disminuir las posibilidades de error dentro de los métodos, generando un grado de confianza en los resultados arrojados por el método validado (Paez, 2008)

1.2 Planteamiento del Problema

Dentro del rubro de los análisis microbiológicos que ofrece el laboratorio, se encuentra a la determinación de bacterias Coliformes. Técnica del número más probable (NOM-112-SSA1-1994) el alcance de esta técnica es aplicable para alimentos y agua, no obstante, la actualización de métodos es constante, esto ya sea para mejorar la técnica o ampliar el alcance de los métodos, es por ello que en el 2014 se llevó a cabo una homologación de métodos en una sola norma la cual es NOM-210-SSA1-2014.-Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos,

Con la norma que entro en vigor por el diario oficial, el día viernes 26 de junio del 2015, en la que se menciona que se tiene 180 días naturas para la aplicación de la norma, mientras que los apéndices entraran en vigor a plazos en este caso la norma que cancela es la NOM-112-SSA1-1994, que da un plazo de 270 días naturas a partir de la norma entrada en vigor (salud, 2014). Es por ello que se requiere actualizar el método con respecto al apéndice H de la norma NOM-210-SSA1-2014 para poder estar en competencias en los ensayos microbiológico con respecta a las normas actuales.

1.3 Objetivo general.

Desarrollar el procedimiento método de análisis del apéndice H, de la NOM-210-SSA1-2014, para su implementación en el laboratorio de ensayo

1.4 Definición de variables

Analizar la técnica de Coliformes totales, fecales y *E. Coli* por número más probable con lo establecido en la NOM-210-SSA1-2014.

Establecer el procedimiento de la determinación por densidad de coliformes totales, fecales y *E. Coli* con respecto a la estructura interna del laboratorio y las especificaciones de la NOM-210-SSA1-2014

1.5 Hipótesis.

El procedimiento para determinar Coliformes totales, termotolerantes y *E. coli* en alimentos y agua para consumo humano describe desde la preparación de la muestra hasta el conteo y confirmación de microorganismos.

1.6 Justificación del Proyecto

Los laboratorios de ensayo necesitan estar en constante actualización referente a las normas emitidas por el Diario Oficial de la Federación, el desarrollo de este trabajo permitirá describir el método de análisis microbiológico establecido en la NOM-210-SSA1-2014. Apéndice H, con ello se pretende ampliar el alcance de los análisis microbiológicos que se realizan en el laboratorio de la UTCV.

1.7 Limitaciones y Alcances.

Este trabajo es aplicable para la determinación por densidad a coliformes totales, fecales y *E. Coli*. Por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua, específicamente a productos con bajos niveles de microorganismos. Mismo que aplica para ser efectuado en el laboratorio de ensayos de la UTCV, esto bajo las condiciones que describen y contemplan los controles y parámetros establecidos internamente.

1.8. UTCV.

La Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz "UTCV" es un organismo público descentralizado del gobierno del Estado de Veracruz, con personalidad jurídica y patrimonio propio integrada al Sistema Nacional de Universidades Tecnológicas, adoptando el modelo pedagógico y los sistemas educativos que señale el Consejo Nacional de Universidades Tecnológicas y la Secretaría de Educación y Cultura, así como por lo establecido en el decreto publicado el 9 de noviembre de 2004 en la gaceta oficial del Estado, decreto por el cual se crea la Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz.

La “UTCV”, se encuentra ubicada en el municipio de Cuitláhuac, en la región centro del Estado de Veracruz, e inicia sus trabajos el 3 de enero de 2005, con cuatro Programas Educativos: Comercialización, Mantenimiento Industrial, Tecnología de Alimentos, Tecnologías de la Información y Comunicación, e Informática Administrativa.

La “UTCV”, está comprometida con la EDUCACIÓN DE CALIDAD y LA MEJORA CONTINUA, por lo que, uno de sus objetivos estratégicos es certificar todos los procesos que intervienen en el quehacer diario, con base en el modelo ISO 9001:2000, ISO 14001 Ambiental. Entre ellos, el proceso educativo, el de gestión y el de educación continua; además, visualiza acreditar cada uno de sus programas educativos con talleres y laboratorios reconocidos nacional e internacionalmente.

1.8.1 Misión institucional.

Contribuir a la formación de profesionales responsables, comprometidos y creativos, con una sólida preparación científico-tecnológica, cultural y valorar, con vinculación nacional e internacional y una imagen institucional sólida.

Con base en un enfoque educativo centrado en el aprendizaje, con profesores vinculados al sector productivo, con planes y programas de estudio pertinentes al entorno, garantizar el aseguramiento de la calidad de los procesos: educativo, de educación continua y de gestión, mediante la certificación, la acreditación y la mejora continua.

Con el propósito de que los egresados coadyuven a la competitividad de las empresas y su capacidad de respuesta al cambio, para fortalecer la calidad de vida de la sociedad bajo parámetros de excelencia académica y la promoción de valores. 3

1.8.2 Valores Institucionales.

Lealtad: Es el sentimiento de apego, fidelidad y respeto; con el que se demuestra el alto sentido de compromiso a la institución y a sus compañeros.

Honestidad: Respeto a la normatividad establecida en la Institución, dentro y fuera de ella.

Responsabilidad: Cumplimiento de las actividades encomendadas, es decir, cumplir el deber, en tiempo, forma y con la calidad deseada.

Trabajo en equipo: Es colaborar con un fin común, el compromiso es compartido para la consecución de metas institucionales y la solución de problemas con equilibrio, basados en un clima de confianza y respeto mutuo.

Igualdad: Es la buena práctica institucional por un trato idéntico, sin que medien diferencias entre todos los que conformamos la comunidad universitaria ya que tenemos los mismos derechos y las mismas oportunidades.

Cuidado del medio ambiente: Respeto institucional hacia el entorno en apego a las normas establecidas para cuidar, proteger y preservar el medio ambiente.

La estructura y operación del Sistema de Gestión del Laboratorio se lleva a cabo con base en los requisitos y directrices de:

- NMX-EC- 17025-IMNC- 2006 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración
- ISO 19011:2002 Directrices para la auditoria de los sistemas de gestión de la calidad y/o ambiental
- Manual de buenas prácticas de laboratorio
- Métodos analíticos adecuados a su propósito Guía de laboratorio para validación de métodos y tópicos relacionados

1.8.3 Política de Calidad.

Satisfacer los requisitos de los empresarios y alumnos que reciben nuestros servicios de análisis fisicoquímicos y microbiológicos a través del cumplimiento y mantenimiento de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) aplicando procedimientos y métodos analíticos (normalizados) con base en la NMX-EC- 17025-IMNC-2006 y asegurando la mejora continua del sistema técnico y administrativo que garanticen la confiabilidad de los resultados analíticos.

1.8.4 Laboratorio de análisis de ensayos de la UTCV.

Las labores del laboratorio de ensayos de la UTCV dio inicio la oferta de servicios de análisis a la industria de la región en 2012-01-27 esto ofreciendo análisis a la industria como lo es análisis bromatológicos para alimentos , fisicoquímicos en agua y microbiológicos, el laboratorio se acreditó ante la entidad mexicana de acreditación “ema” esto para acreditar al laboratorio de ensayos en la ISO/IEC- 17025 que refiere a la administración de los laboratorio, así mismo se dio de alta unas técnicas para a validación o la verificación del método.

En la actualidad el laboratorio de ensayos de la UTCV cuenta con acreditaciones en análisis bromatológicos, fisicoquímicos y microbiológicos.

Determinación de sólidos, sólidos totales y sólidos en suspensión en agua.

- Determinación de cloruros en agua.
- Determinación de alcalinidad en agua.
- Determinación de conductividad en agua
- Determinación de proteínas en alimentos
- Determinación de cenizas en alimentos
- Determinación de humedad en alimentos por tratamiento térmico.
- Determinación y enumeración de organismos coliformes, organismos coliformes termotolerantes y *Escherichia Coli*
- Determinación de Bacterias Coliformes.
- Método para la Cuenta de Microorganismos Coliformes Totales en Placa.

Actualmente en el laboratorio se mantiene una SGC e base a la ISO 9000 y a la ISO/IEC 17025, 2015 está en la versión actual, esto para mantener actualizado y con mejora continua el SGC del laboratorio de ensayos

CAPÍTULO 2.

METODOLOGÍA

Para el desarrollo de este trabajo se siguieron los siguientes puntos:

2.1- Análisis e interpretación de la NOM-210-SSA1-2014.

Se analizará la estructura de la norma ya que contiene más métodos de análisis de patógenos.

2.2- Identificación de formato internos establecidos para los procedimientos de análisis microbiológicos.

Se revisarán los procedimientos internos del laboratorio, delimitar si aplica el procedimiento de verificación de métodos.

2.3.-Diseño de la estructura del procedimiento de la determinación densidad de Coliformes totales, fecales y E. Coli por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua.

Se realizará un comparativo de la estructura de un procedimiento interno esto respecto a la estructura de la metodología del apéndice H.

2.4.-Elaboración de procedimientos y formatos.

Se elaborará un procedimiento respecto a la norma NOM-210-SSA1-2014 y a su vez un procedimiento.

CAPÍTULO 3

DESARROLLO DEL PROYECTO

3.1- Análisis e interpretación de la NOM-210-SSA1-2014, interpretación de la norma.

Para iniciar con el análisis de la norma, se recurrió a la consulta de la norma, la cual se descargó en el Diario Oficial de la Federación

Se revisó detalladamente cada uno de los numerales del apéndice H establecidos en la norma NOM-210-SSA1-20014 junto con el asesor, esto para diferenciar los cambios con respecto a la norma que sustituyó la NOM-112-1994.

3.2.- Identificación de formato internos establecidos para los procedimientos de análisis microbiológicos.

Se identificación de los procedimiento de análisis microbiológicos que se desarrollan en el laboratorio los cuales son cualitativos y cuantitativos, es necesario identificar la estructura de los procedimientos para saber su interpretación.

Se revisaron los un formatos como lo son las plantillas digitales, observando su estructura para el desarrollo de los nuevos formatos, la cual se identificaron con los siguientes puntos .

- Información de muestra
- Método empleado
- Cantidad y especificación de reactivos utilizados en el análisis
- Numero de repeticiones, promedios, desviación estándar
- Formula y desarrollo del resultado.
- Controles de calidad

3.3.-Estructura del procedimiento de la determinación densidad de coliformes totales, fecales y *E. Coli* por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua.

Para la estructura del proyecto se prosiguió con la identificaron de los puntos que conforma un procedimiento interno y la metodología planteado por la NOM-210-SSA1-2014 apéndice H.

Estructura de procedimiento interno	Estructura de procedimiento bajo la normativa
Objetivo	Introducción
Alcance	Equipos, materiales y medios de cultivo
Fundamento	Procedimiento analítico
Definiciones	Cálculos
Materiales , equipos y reactivos	Tablas
Limpieza del material	Estabilidad de la técnica microbiana por la técnica NMP
Procedimiento analítico	Cálculo aproximado de NMP y el 95% de límite de confianza
Cálculos	Interpretación de resultados
Controles de calidad	Medios de control de calidad y valides la prueba.
Tablas	Preparación de medios de cultivo.

Tabla. 1- Comparación de estructura de procedimientos.

En la tabla 1 se muestra un comparativo de un procedimiento interno y la metodología de la normativa correspondiente, esta para marcar un margen comparativo de ambas metodologías, y proponer una metodología homologa de ambas.

3.4.-Elaboración de procedimientos y formatos

El procedimiento de análisis microbiológicos consta de los siguientes puntos.

Objetivo: se redacta conforme lo establecido en la norma contemplando las competencias del laboratorio.

Alcance: en este punto menciona el impacto que tiene, en el fundamento y en la describen de puntos más importantes del cual conste el método de análisis.

Definiciones: en este apartado es donde se colocan las palabras clave de la técnica y se describen brevemente esto para que sea más fácil de comprender Reactivos, equipos y material: se enlistan todos los materiales que se requieren para llevar a cabo la técnica, en esta se describe que tipo de material se debe de utilizar, si es de clase A, material de referencia, equipos y materiales con certificado de análisis.

Descripción del procedimiento: en este apartado se describen los pasos a seguir para llevar a cabo la técnica, se realiza una descripción detallada de cómo se va a realizar la técnica, en esta incluye variables que se deben de contemplar, considerar un diagrama de proceso para llevar de forma sistemática u ordenada cada paso a seguir.

Cálculos: se describen los cálculos matemáticos que se deben de elaborar, en esta incluye la interpretación y desarrollo de fórmulas para obtener unos resultados de forma numérica

Controles de calidad: Son parámetros los cuales el laboratorio coloca para asegurar la calidad y veracidad de los resultados. Entre los parámetros de control de calidad que se pueden aplicar se encuentra el colocar un blanco de reactivos, realizar un duplicado de cada muestra a evaluar, utilizar material volumétrico clase A así como realizar la verificación del material de medición y quipos que influyen en el análisis.

Este equipo o material debe de ser calibrado para tomar en cuenta la incertidumbre de medición y con ello obtener una medición un tanto más precisa, otro parámetro de control de calidad es que todos los reactivos que utilizemos cuenten con su certificado de análisis.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y CONCLUSIONES.

4.1 Resultados.

Como resultado de este proyecto se obtuvo un procedimiento para el análisis microbiológico en base a la NOM-210-SSA1-2014, el cual se muestra en el anexo 1, y el formato en el anexo 2

	UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DEL CENTRO DE VERACRUZ	CÓDIGO-REV.	
	Apéndice H Normativo. Método aprobado para la estimación de la densidad de Coliformes totales, fecales y <i>E. coli</i> por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua. (basado en la NOM-210-SSA1-2014)	RESPONSABLE DE LA EFICACIA (CÓDIGO-FIRMA)	DAC02 PA
		No. PROCESO	
		Página 1 de 18	

1. Objetivo.

Describir el método para la estimación de la densidad de coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli* por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua.

2. Alcance.

Este procedimiento es aplicable para la estimación de la densidad de coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli* por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua. Este procedimiento aplica la detección de coliformes fecales y *E. coli*, especialmente en productos que se encuentran en bajas concentraciones de microorganismos.

3. Fundamento

Figura 2. Estructura de encabezado de documento

En este procedimiento se redactó con las especificaciones internas del laboratorio la cual está acreditado con la norma ISO/IEC 17025 en esta se estable un control de documentos, con ciertos criterios para que estos documentos están controlados en su limitación a personas que pueden tener su acceso por parte del SGC. Se muestra en la figura 2, la portada del procedimiento con las especificaciones para su control por el SGC.

La estructura del procedimiento se obtuvo una revisión y el análisis de la normativa correspondiente y los formatos internos del laboratorio, la cual se muestra en el anexo 1. Procedimiento para la determinación de coliformes fecales, termotolerantes y *E. Coli* por la técnica de número más probable. El procedimiento cuenta con un objetivo la cual se generó en base a

la normativo y a los criterios de la misma, así también se redactó un alcance en la cual se estipula las limitaciones y alcance de la misma, puesto que es un procedimiento interno de laboratorio, la parte de fundamentos y definiciones se estableció mediante referencias bibliográficas en la cual se describe una breve introducción al análisis y los tecnicismos empleado dentro del procedimiento, los materiales y el métodos se estableció de acuerdo a la normativa (NOM-210-SSA1-2014 apéndice H). Así mismo la expresión de los resultados y los controles de calidad se determinaron de acuerdo a lo que marca la normativa y a lo establecido por el laboratorio, en el procedimiento de aseguramiento de los resultados.


UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DEL CENTRO DE VERACRUZ		CÓDIGO-RE	FOLIO-A
		técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua. (basado en la NOM-210-SSA1-2014)	
		RESPONSABLE DE LA EFICACIA	DACEZ-PA
		N. PROCES	2
		Página 1 de 2	
ANALISTA:		INCERTIDUMBRE:	Todo el proceso no debe realizarse más allá de los PRLADIS
MUESTRA:		UNIDADES:	La limpieza de material no debe realizarse más allá de los PRLADIS
FOLIO:		VOL. EMPLEADO [ml]:	
FECHA:			
Materiales:	Código/Lote	Equipos:	Código Equipos: Código
Probeta de 100ml		Palanca analítica con precisión de 0.001g	Analizador
		Marca de pesas	Marca
		Palanca térmica con sensor de temperatura	Campana de flujo laminar
		Termómetro	Incubadora
			Termómetro de máxima
Reactivos emplear	Para / Volumen u unidad	Unidad	Lote Marca
			Criterios a Considerar
			Observaciones del analista
Agua destilada			
Probeta de acero inoxidable			
Cloruro de sodio			
Calle A-1			

Figura 3. Formato para el reporte de análisis.

El formato para el reporte de análisis que se muestra en la figura 3, es una bitácora digital en la cual se debe de reportar los resultados del análisis, los materiales y los equipos que se utilizaron para el desarrollo de la técnica, se estableció y se tomó como referencia un forma interno la cual describe el método para la determinación e identificación de Coliformes totales, termotolerantes y *E. Coli*, está por el método de filtración por membrana.

4.2.-Conclusiones

Se elaboró el procedimiento para la determinación de coliformes totales, termotolerantes y *E. Coli*, en alimentos y agua para consumo humano, siguiendo la estructura establecida para la elaboración de procedimientos dentro del laboratorio de ensayos de la UTCV.

El procedimiento describe la preparación de la muestra, medios de cultivo, reactivos, la metodología empleada para el análisis así como realizar el conteo de UFC por NMP en la muestra analizada.

4.3- Trabajos Futuros y recomendaciones

Dar de alta el procedimiento para la asignación de un código de control por el SGC de la universidad.

Aplicación del procedimiento, con sus controles de calidad para cada análisis elaborado.

Se recomienda la verificación del método de análisis con el desarrollo de un diseño de experimentos para calcular niveles de confianza del método.

Llevar al proceso de acreditación ante la Entidad Mexicana de Acreditación "ema" para la nueva metodología de análisis propuesta.

Actualizar el método y formato cada determinado tiempo o cuando se detecte una mejora para su uso.

ANEXOS

Anexo 1. Procedimiento para la determinación de coliformes fecales, termotolerantes y *E. Coli* por la técnica de número más probable.

	UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DEL CENTRO DE VERACRUZ	CÓDIGO-REV.	PRLAB
	Apéndice H Normativo. Método aprobado para la estimación de la densidad de Coliformes totales, fecales y <i>E. coli</i> por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua. (basado en la NOM-210-SSA1-2014)	RESPONSABLE DE LA EFICACIA (CÓDIGO-FIRMA)	DAC02 PA 12/01/2018
		No. PROCESO	
	Página 1 de 21		

Objetivo.

Describir el método para la estimación de la densidad de coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli* por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua, ejecutable en el laboratorio de ensayos de la UTCV.

2. Alcance.

Este procedimiento es aplicable para la estimación de la densidad de coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli* por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua. Este procedimiento aplica la detección de coliformes fecales y *E. coli*, especialmente en productos que se encuentran en bajas concentraciones de microorganismos.

3. Fundamento

En la actualidad se utilizan 3 grupos de indicadores microbianos con diferentes aplicaciones. La detección de bacterias del grupo coliformes se usan como indicador de la calidad sanitaria del agua o como indicador de las condiciones sanitarias en el procesamiento de alimentos. Los coliformes totales, fecales y *E. coli* continúan siendo el indicador de elección que manifiesta contaminación fecal reciente o condiciones higiénicas inadecuadas.

El principio de la técnica 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 microorganismos coliformes para producir gas a partir de la fermentación de lactosa a $45.5^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ (para alimentos) $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ (para agua) dentro de las 48h de incubación (coliformes fecales y *E. coli*).

Para obtener el 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.

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 cepas o especies de *Shigella* (44%-58%) y *Salmonella spp* (20%-29%) son GUD positivas, sin embargo, no se considera una desventaja de esta prueba para su uso en salud pública.

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 tubos. A medida que el número de tubos inoculados para cada dilución aumenta, se reducen los límites de confianza.

4. Definiciones

Coliformes: Bacilos Gram negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos, que a 35 °C fermentan la lactosa con la producción de gas bajo las condiciones específicas.

Termotolerantes: Los coliformes termotolerantes integran el grupo de los coliformes totales, pero se diferencian de estos últimos, en que son indolo positivo, su intervalo de temperatura óptima de crecimiento es muy amplio (hasta 45 °C) y son mejores indicadores de higiene en alimentos y agua.

Microorganismo indicador: Son aquellos que tienen un comportamiento similar a los patógenos en cuanto a concentración en las aguas y reacción frente a factores ambientales, pero son más fáciles, rápidos y económicos de identificar.

Medio de cultivo: Un medio de cultivo es un sustrato o una solución de nutrientes que permite el desarrollo de microorganismos.

Dilución primaria. : Es 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.

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

NMP. Expresión referida a Número Más Probable en una determinación en medios de cultivo líquidos.

Escherichia coli: bacteria habitual en el intestino del ser humano y de otros animales de sangre caliente. Aunque la mayoría de las cepas son inofensivas, algunas pueden causar una grave enfermedad de transmisión alimentaria. La infección por *E. coli* se transmite generalmente por consumo de agua o alimentos contaminados, como productos cárnicos poco cocidos y leche cruda.

5. Materiales, equipos y reactivos

Baño de agua con cubierta y recirculación constante que alcance una temperatura de 44.5° C, 45.5°C ± 0.2 °C;

- Lámpara de luz UV de 365nm longitud de onda;
- Incubadora de aire que mantenga una temperatura de 35°C ± 0.5°C;
- Balanza con capacidad adecuada y sensibilidad de 0.1g;
- Motor de licuadora u homogeneizador peristáltico;
- Potenciómetro con sensibilidad de 0.1 de unidad de pH;
- Mecheros Bunsen, y

- Autoclave que mantenga una temperatura interna de 121°C bajo una presión de 15 psi (1 bar), equipado con termómetro calibrado y manómetro de presión calibrado, previamente calificada.

MATERIALES.

- Tubos de cultivo de 18mm x 150mm, 18mm x 200mm, 16mm x 150mm, 16mm x 160mm, 22 x 175mm con tapón de rosca;
- Tubos de fermentación (campanas de Durham);
- Gradillas de plástico y metal;
- Asas bacteriológicas;
- Lentes protectores
- Termómetro de máximas para autoclave con división mínima de 0.5°C calibrado. Se deberá registrar la inspección trimestral de la columna de mercurio del termómetro con una lupa en búsqueda de rupturas de la misma, si se observa éste deberá salir de uso;
- Termómetro de inmersión total de 379mm de longitud de 25°C a 55°C, una escala auxiliar a 0°C con subdivisiones de 0.1°C con una precisión y exactitud de $\pm 0.1^\circ\text{C}$.
- Se deberá registrar la inspección anual de la columna de mercurio del termómetro con una lupa en búsqueda de rupturas de la misma, si se observa éste deberá salir de uso;
- Cinta testigo para procesos de esterilización por calor húmedo;
- Vasos de licuadora estéril o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico;
- Pipetas graduadas bacteriológicas de 0.1mL, 1mL, 2mL, 5mL y 10mL;
- Probetas de 100mL, 500mL y 1000mL;
- Frascos de dilución de vidrio de borosilicato con tapón esmerilado;
- Frascos con capacidad 500mL con tapa de rosca, y
- Espátulas, cucharas, cuchillos, pinzas.

MEDIOS DE CULTIVO.

- Caldo A-1;
- Caldo lauril triptosa;
- Caldo EC;
- EMB-L;
- Caldo triptona al 1%;
- Caldo RM – VP;
- Caldo Citrato de Koser;
- Citrato de Simmon;
- Caldo Lauril triptosa con MUG;
- Caldo Verde Brillante Lactosa Bilis;
- Agar Mc Conde;
- Agar Nutritivo;
- Agar Cuenta Estándar, y
- Caldo Lauril con MUG.
- REACTIVOS.
- Regulador de fosfatos solución concentrada;
- Diluyente de peptona al 0.1%;
- Reactivo de Kovac;
- Reactivo de VP;
- Indicador rojo de metilo, y.
- Reactivos para la coloración de Gram.

Cepas de referencia.

- *E. coli* ATCC 25922, y
- *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048.

Limpieza del material.

Realiza la limpieza del material de vidrio a utilizar para el análisis de la muestra de acuerdo al procedimiento (PRLAB08) y documenta los resultados en el formato (FOLAB119). Una vez lavado los materiales se procede a la preparación y esterilización de los mismos.

6.- PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.

6.1. Procedimiento para determinar coliformes Totales, Fecales y *E. coli* en agua y hielo.

6.1. Prueba presuntiva. Agitar vigorosamente la muestra veinticinco veces en un arco de 30° por 7s, la cantidad necesaria para el análisis deberá ser de 100mL como mínimo e inocular el caldo lauril triptosa a la concentración adecuada, como se describe en el punto H.14.1.2.

6.1.2 Agua para uso y consumo humano y envasado. Transferir 5 porciones de 20mL, 10 mL o una porción de 100mL. Consultar la tabla H.14.1.2, para seleccionar las diferentes concentraciones de caldo lauril de acuerdo a los diferentes volúmenes de muestra a inocular.

6.1.3 Agua para uso recreativo. Utilizar cinco tubos de caldo lauril por cada porción de 10mL, 1mL y 0.1mL, hacer diluciones decimales cuando se espere una densidad microbiana alta. Consultar las Tablas H.14.1.2.

6.1.4 Hielo. Fundir por completo el hielo a 45°C y realizar el análisis como agua para uso y consumo humano. Incubar los tubos de caldo lauril inoculados a 35°C ± 0.5°C por 24h a 48 h. Examinar los tubos a las 24h y observar si hay evidente formación de gas. Si no se observa la formación de gas, incubar 24h más y anotar los resultados.

6.1.5 Prueba confirmativa. De cada tubo que muestre formación de gas, tomar una asada y sembrar en un número igual de tubos de Caldo EC para la prueba confirmativa; inocular en tubos de EC un control positivo de *E. coli* y un control negativo de *Enterobacter aerogenes* e incubar con las muestras.

6.1.6 Incubar los tubos para prueba de coliformes totales a 35°C ± 0.5°C por 48h ± 2h y para la prueba de coliformes fecales a 45.5°C ± 0.2°C en baño de agua con recirculación continua durante 24h, observar si hay formación de gas, registrar la lectura, en caso de no haber formación de gas, incubar 24h más. Utilizar estos resultados para calcular el NMP de Coliformes totales y coliformes fecales respetivamente. Consultar la sección de cálculos.

Nota: Para todos los alimentos que se les determine coliformes fecales, la incubación debe ser a 45.5°C ± 0.2°C por 24h a 48h, excepto para muestras de agua que deberán incubarse a 44.5°C ± 0.2°C durante 24h a 48h.

6.1.7. Agua de mar para el cultivo de moluscos bivalvos. Agitar la muestra vigorosamente veinticinco veces en un arco de 30cm por 7s. Para la prueba de coliformes fecales, inocular la muestra de agua de mar directamente en cinco tubos conteniendo el Caldo A-1, por dilución en porciones de 10mL, 1mL y 0.1 mL en Medio A-1.

Incubar por 3h a 35°C ± 0.5°C para un periodo de resucitación, pasado este tiempo de incubación colocar los tubos en un baño de agua a 44.5°C ± 0.2°C por 21h ± 2h.

La producción de gas y/o efervescencia manifestada por una agitación suave de los tubos de Caldo A-1 incubados dentro de las 24h, indica una reacción positiva a coliformes de origen fecal. Para calcular el NMP/100mL consultar la Tabla correspondiente Tabla 2.

6.2. Prueba complementaria.

6.2.1. Esta es una prueba optativa 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. Tomar una asada de cada uno de los tubos positivos de caldo verde brillante y sembrar por estría cruzada en agar Mc Conkey. Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 2\text{h}$. Observar las colonias típicas fermentadoras de color rosa intenso que pueden estar rodeadas de un halo opaco de precipitación de las sales biliares.

6.2.2. 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. Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ examinar los tubos a las 24h y observar si hay formación de gas. Anotar los resultados. Si la formación de gas no se observa, incubar 24h más y anotar los resultados.

6.2.3 Realizar tinción de Gram a partir del crecimiento en el agar nutritivo para observación de la morfología microscópica de las colonias.

6.2.4 La formación de gas en los tubos de caldo lauril sulfato dentro de las $48\text{h} \pm 3\text{h}$ y la observación de bacterias Gram negativas, en forma de bacilos no esporulados constituyen una prueba positiva a la presencia del grupo coliforme.

6.2.5. Prueba confirmativa para *E. coli* (por identificación bioquímica).

6.2.6. Prueba presuntiva.

6.2.7. Tomar una asada de cada uno de los tubos positivos de caldo EC y/o Caldo A-1 y sembrar por estría cruzada en agar EMB-L para su aislamiento. Incubar las placas invertidas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18^{\circ}\text{C} - 24\text{h}$. Seleccionar 2 colonias de cada placa con la morfología colonial típica: 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 $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18h -a 24h.

6.2.8. Si no hay colonias con morfología típica, probar 1 o más colonias lo más parecido a *E. coli* de cada placa. Realizar un frotis y teñirlo por Gram. Observar al microscopio la presencia de bacilos cortos Gram negativos.

6.2.9. Pruebas bioquímicas: Indol, Rojo de metilo, VP, citrato.

6.2.10. Producción de indol. Inocular un tubo con caldo triptona e incubarlo a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 2\text{h}$. Adicionar 0.2mL a 0.3mL de reactivo de Kovac, dejando caer las gotas del reactivo por las paredes del tubo y no agitar los tubos para observación del anillo rojo en la superficie. La presencia de una coloración roja en la superficie del tubo se considera una prueba positiva.

6.2.11. VP. Inocular un tubo con caldo MR-VP e incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por $48\text{h} \pm 2\text{h}$. Transferir 1mL a un tubo de 13mm x 100mm. Adicionar 0.6mL de solución α -naftol y 0.2mL de KOH al 40% y agitar. Cuando se desarrolla un color de rosa a rojo en 15min a 30min, se considera una prueba positiva.

6.2.12 Rojo de metilo. A la otra parte del caldo MR-VP inocular adicionar cinco 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.

6.2.13 Citrato. Sembrar con inóculo ligero un tubo con caldo citrato de Koser, evitar turbiedad en el tubo. Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 96h. Una reacción positiva se observa mediante el desarrollo de turbiedad detectable. Se puede utilizar como alternativa citrato de Simmon el cual se debe inocular por estría. Incubar $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 48h. Una prueba positiva se observa mediante crecimiento y/o cambio a una coloración azul; la ausencia de crecimiento se considera una prueba negativa.

6.3. Interpretación de resultados de las pruebas bioquímicas.

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

Pruebas	Biotipo 1*	Biotipo 2*
Indol	+	-
RM	+	+
VP	-	-
Citrato	-	-

Son consideradas como *E. Coli*.

6.3.2 Calcular el NMP de *E. coli* basada en la proporción de los tubos positivos de caldo EC confirmados. Consultar el punto H.8 (resultados) Cálculos.

6.4. Prueba para detectar *E. Coli* en alimentos refrigerados o congelados.

6.4.1 Prueba Presuntiva. Seguir lo indicado en el punto 6.5. 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 una cepa de *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048) como control negativo, para facilitar la diferenciación entre los tubos que presenten sólo crecimiento y crecimiento con fluorescencia. Inocular los tubos por 24h a 48h ± 2h a 35°C. Examinar cada tubo con crecimiento (turbiedad y gas), después, observar los tubos en la oscuridad con una lámpara de luz UV. Una prueba positiva para *E. Coli* es la presencia de fluorescencia en el tubo. La lectura a las 24h de incubación, identifica a *E. Coli* en un 83%-95%, mientras que a las 48h de incubación la identifica en un 96%-100%.

6.4.2 Prueba confirmativa. Confirmar todos los tubos positivos estriando en una placa de agar L-EMB, incubar a 35°C ± 1°C por 24h y continuar como se indica en el punto 6.2.7.

6.4.3 Prueba confirmativa para *E. coli* (por identificación bioquímica). Calcular el NMP de *E. coli* basada en la confirmación de tubos en las tres diluciones consecutivas.

6.5. Procedimiento para Alimentos.

6.5.1 Prueba Presuntiva. Pesar 25g del alimento en 225mL de regulador de fosfatos o diluyente de peptona y moler 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 mantenerse en refrigeración (2°C-5°C) un máximo de 18h antes de su análisis, sin llegar a la descongelación. En caso de que la cantidad de muestra disponible sea menor a 25g y el análisis necesite ser efectuado (por denuncia o queja ante la autoridad), utilizar una cantidad de muestra que represente una proporción 1:10.

6.5.2. 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 30cm por 7s transferir volúmenes de 1mL a tres tubos con 10mL de caldo lauril triptosa, 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 min a 20 min.

6.5.3 Utilizar como medio de enriquecimiento caldo lauril triptosa, una vez inoculados incubar a 35°C ± 0.5°C. Examinar los tubos a las 24h y observar si hay formación de gas. Anotar los resultados. Si la formación de gas no se observa, incubar 24h más y anotar los resultados.

6.5.4. Prueba Confirmativa. Continuar como se indica en el 6.1.5. Prueba Confirmatoria, considerando que si la formación de gas no se observa, continuar la incubación 24h más.

7. CALCULOS.

7.1. Con frecuencia es necesario calcular el NMP con cantidades de muestra diferentes de los enlistados en las Tablas H.8.4 desde el primer número de la combinación encontrada. Si la cantidad de muestra >0.01g multiplicar el NMP enlistado en la tabla utilizada dependiendo del procedimiento realizado por 10.

7.2. Una determinación de cinco tubos que dé tres tubos positivos en 0.01g; dos tubos positivos en 0.001g y un tubo positivo en 0.0001g (3-2-1) el resultado obtenido al leer en la Tabla 2, es 17, multiplicar por 10 para así obtener 170 como el NMP final por g de muestra. De igual forma si la cantidad más grande utilizada para la tabla de referencia es 1g en lugar de 0.1g, dividir el NMP derivado de la Tabla entre 10. Por ejemplo, el resultado de la determinación del NMP en tres tubos para E. coli que dé tres tubos positivos en 1g; un tubo positivo en 0.1g y ningún positivo en 0.01g (3-1-0) el resultado obtenido al leer en la Tabla 1 es 43 y dividir entre 10, lo que da 4.3 como el NMP presuntivo por g de muestra.

7.3 Un método alternativo para obtener el NMP es usando la siguiente fórmula:

(NMP/g de la tabla - 100) X factor de dilución del tubo de en medio = NMP/g.

Para calcular el NMP/100 g multiplicar por 100.

Tablas.

Tabla 1. NMP para 1g de muestra cuando se usan tres tubos con porciones de 0.1; 0.01 y 0.001g.

Tubos Positivos				Tubos Positivos				Tubos Positivos				Tubos Positivos			
0,1	0,01	0,001	NMP	0,1	0,01	0,001	NMP	0,1	0,01	0,001	NMP	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 International, 18 ed. 2005. Chapter 17.3, pag. 5

Tabla 2. NMP para 100mL de muestra cuando se usan 5 porciones en cada una de tres 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 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	10 mL	1 mL	0.1 mL	NMP	10 mL	1 mL	0.1 mL	NMP
0	0	0	<1.8	1	0	0	2.0	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	4.0	2	0	1	8.8	3	0	1	11	4	0	1	17	5	0	1	31
0	0	2	2.6	1	0	2	8.0	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	8.0	2	0	3	12	3	0	3	16	4	0	3	25	5	0	3	56
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	4.0	2	1	0	8.8	3	1	0	11	4	1	0	17	5	1	0	33
0	1	1	2.6	1	1	1	8.1	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	83
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	36	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	2.7	1	2	0	8.1	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	94
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	32	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	42	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	300
0	5	2	13	1	5	2	17	2	5	2	23	3	5	2	32	4	5	2	56	5	5	2	340
0	5	3	15	1	5	3	19	2	5	3	26	3	5	3	37	4	5	3	64	5	5	3	400
0	5	4	17	1	5	4	22	2	5	4	29	3	5	4	41	4	5	4	72	5	5	4	500
0	5	5	19	1	5	5	24	2	5	5	32	3	5	5	45	4	5	5	81	5	5	5	>1000

Referencia: Official Methods of Analysis of AOAC International, 18 ed. 2006, Chapter 17.3.

Tabla 3. NMP 100mL de muestra de agua o hielo e intervalos de confianza del 95% utilizando cinco tubos con 20 mL de muestra.

Tubos positivo	NMP/100mL	95% de Limite 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. NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando diez tubos con 10mL de muestra.

Tubos positivos	NMP/100mL	Limite de confianza	
		Inferior	Superior
0	<1.1	-	3.3
1	1.1	0.05	5.9
2	2.2	0.37	8.1
3	3.6	0.91	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: Americana Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th edition 1998. Washington DC.

Tabla 5. NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando tres tubos con 0.1g, 0.01g y 0.001g de muestra

NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando tres tubos con 0.1g, 0.01g y 0.001g de muestra.											
Tubos positivos			NMP/g	Limite de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Limite 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 Edición, Revisión A, 1996 Actualización Diciembre 2003.

Tabla 6. NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando cinco tubos con 0.1g, 0.01g y 0.001 g de muestra.

NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando cinco tubos con 0.1g, 0.01g y 0.001 g de muestra.											
Tubos positivos			NMP/g	Límites de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Límites 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

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
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
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	-

Tabla 7. NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando diez tubos con 0.1g, 0.01g y 0.001g de muestra.

NMP por gramo de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando 10 tubos con 0.1; 0.01 y 0.001 g de muestra											
Tubos positivos			NMP/g	Limite de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Limite de confianza	
0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior
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
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	5	5	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
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	1	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
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	7.1	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	-

Tabla 8. NMP por 100mL de muestra inoculando tubos de cada una de tres diluciones geométricas.

Tubos positivos mL			NMP	Tubos positivos mL			NMP	Tubos positivos mL			NMP	Tubos positivos mL			NMP
10	1	0.1		10	1	0.1		10	1	0.1		10	1	0.1	
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.

8. ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD MICROBIANA POR LA TÉCNICA DE NMP. Uso de Tablas de NMP con 95% de límite de confianza.

8.1 Las tablas 5, tabla 6 y tabla 7 presentan la estimación estadística de los valores del NMP que corresponden al 95% de límite de confianza cuando se utilizan tres, cinco y diez 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 H.9 y el 95% de Límite de Confianza) para tener el NMP aproximado (para las combinaciones de tres y cinco tubos).

8.2 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.

8.3 Cuando se preparan más de tres 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 dos siguientes diluciones mayores. 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. Cuando se presenta un resultado positivo en la dilución más alta no seleccionada (menor cantidad de muestra), sumar el número de tubos positivos a la dilución más alta seleccionada. Cuando todos los tubos de todas las diluciones son positivos seleccionar las tres diluciones más altas.

8.4. Ejemplo para determinar el NMP estimado en series de 3 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/100g (mL)

8.5. Ejemplo para determinar el NMP estimado en series de cinco tubos con 1g (mL) de muestra por tubo.

Ejemplo	Cantidad de muestra (g o mL)a					Valores positivos reportados	NMP estimado/g o mLb
	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).

9. CÁLCULO APROXIMADO DEL NMP Y EL 95% DE LÍMITE DE CONFIANZA.

9.1 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 tres, cinco y diez tubos por dilución, incluso usando un método aceptado, pueden presentarse datos irregulares o accidentes de laboratorio que causan pérdida de uno 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:

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

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

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

MUESTRA (g)	No. DE TUBOS	No. DE TUBOS POSITIVOS
8	5	5
4	5	4
2	5	2
1	5	0
0.5	5	1
0.25	5	0

El número de tubos positivos es:

$$P = (5 + 4 + 2 + 1) = 12;$$

$$N = (8 \times 0) + (4 \times 1) + (2 \times 3) + (1 \times 5) + (0.5 \times 4) + (0.25 \times 5) = 18,25; y$$

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

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

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

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

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

Dónde: 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:

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

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

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

10. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

10.1 Expresar en NMP/g o mL para alimentos y NMP/100mL para agua.

10.2 Cuando se obtienen resultados negativos (ausencia de gas en los tubos), informar el límite de detección que corresponde a menos del valor más bajo del NMP de la Tabla utilizada. Excepto en los casos de agua para uso y consumo humano que como lo indica la Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización, debe expresarse como "No detectable" o "ND".

11. CONTROL DE CALIDAD.

11.1 Verificar la funcionalidad del procedimiento analítico mediante cultivos control con cepas de *E. Coli* y *E. aerogenes* para coliformes fecales y *E. Coli* y *K. pneumoniae* para la determinación de *E. Coli* con caldo EC-MUG.

11.2 Registrar las temperaturas de incubación con termómetros verificados.

11.3 Pesarse la muestra en balanza calibrada y verificada.

11.4 Verificar el ciclo de esterilización de autoclaves con indicador biológico y termómetro de máximas calibrado o verificado.

Se colocará en cada carga de materiales y reactivos a utilizar en el ensayo, el termómetro de máximos y mínimos para evaluar la efectividad del esterilizado y se reportará dicho proceso en el FOLAB23. En caso de que la temperatura registrada en el termómetro no alcance los 121°C y no se cumpla el ciclo de 15 min., se procederá a esterilizar nuevamente el material hasta completar dicho ciclo. Para el caso de agua de dilución y medios de cultivo se comenzará nuevamente el proceso de preparación y esterilización

Control de esterilidad en medios.

Se realiza la Verificación de la esterilidad del medio de cultivo, una vez que se preparan y esterilizan los medios de cultivo, se toma al menos un tubo de cada medio de cultivo que se prepare y se realiza la incubación a 35 ± 0.5 °C por 24 ± 2 h. Un resultado positivo de crecimiento indica esterilización no adecuada.

11.6 Realizar control ambiental por el método de sedimentación.

Control del ambiente del área de siembra.

Se esteriliza el área de siembra con lámpara UV por un tiempo de 15 min. Esta actividad es verificada colocando los medios de cultivo a exposición durante el tiempo que se trabaja la muestra. Una vez concluido el trabajo con la muestra, los tubos de cultivo son retirados e incubados a 35 ± 0.5 °C por 24 ± 2 h. Un resultado positivo de crecimiento indica contaminación del ambiente.

11.7 Realizar control de medios de cultivo con cepas tipo (evaluación biológica) y evaluación física. Verificar el crecimiento de controles positivos y negativos de cepas con ATCC en cada uno de los medios preparados, se debe utilizar al menos un control positivo o negativo. Se realiza una siembra de las cepas en los medios de cultivo que se preparen en este método y se realiza la incubación a 35 ± 0.5 °C por 24 ± 2 h. Los resultados de esta actividad se deben leer como lo indican las tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1. Control positivo y negativo del caldo lactosado

Microorganismo	ATCC	Características de las colonias
<i>Escherichia coli</i>	25922	Crecimiento satisfactorio, con producción de gas.

Tabla 2. Control positivo y negativo del caldo lauril sultato triptosa

Microorganismo	ATCC	Características de las colonias
<i>Escherichia coli</i>	25922	Crecimiento satisfactorio, con producción de gas.
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	Inhibido, sin formación de gas.

Tabla 3. Controles positivos y negativos del caldo verde brillante bilis lactosa

Microorganismo	ATCC	Características de las colonias
<i>Escherichia coli</i>	25922	Buen crecimiento con formación de gas, recuperación mayor
		95%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	Buen crecimiento con formación de gas, recuperación mayor
		95%
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Crecimiento inhibido, recuperación 0%

12. Elaboración del informe de ensayo.

Se elabora el informe de ensayo utilizando el FOLAB llenando adecuadamente cada uno de los datos correspondientes a la muestra, la técnica y la cantidad de muestra empleada para el análisis. Además de cualquier suceso particular observado durante el curso del análisis y cualquier operación no especificada en el método o considerada opcional que pueda haber influido en los resultados, cuando aplique

12 VALIDEZ DE LA PRUEBA.

12.1 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.


12.2 Si el crecimiento de los controles no es característico, la prueba se invalida.

Bibliografía.

NOM-210-SSA1-2014, Apéndice H Normativo. 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.

NOM-112-SSA1-1995. Determinación de coliformes totales por número más probable NMP

Anexo 2. Formato para el reporte de la determinación de coliformes totales, termotolerantes y *E. Coli* por la técnica del NPM.

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DEL CENTRO DE VERACRUZ		CÓDIGO DE LA EFICACIA (CÓDIGO)	FOLIO-A
		la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua. (basado en la NOM-210-SSA1-2014)	
		BODE DE LA EFICACIA (CÓDIGO) No. PROCES	BAC2-PA Z
		Página 4 de 2	
ANALISTA: MUESTRA: FOLIO: FECHA:		INCERTIDUMBRE: UNIDADES: VOL. EMPLEADO (mL):	Toda el proceso debe realizar con base en el PRLAB05 La limpieza de material se debe realizar con base en el PRI
Materiales: Próbete de 100 mL	Código/Lote	Equipar: Balanza analítica con precisión de 0.0001g Marca de pesar Potenciómetro con compensador de temperatura Termómetro	Código Equipar: Autoclavo Horno Campana de flujo laminar Incubadora Termómetro de máximo
Reactivos empleados Agua destilada	Para / Volumen / unidad	Unidad Lote Marca	Criterios o Cuantitativos Observaciones del analista
Reactivos empleados Agua destilada Poptona de carboxina Clarura de radia Calda A-1 Calda lauril triptana EMB-L Calda triptana al 1% Calda MR-VP Calda citrato bazo Sitrato de zimman Calda lauril triptana con MUG Cloda verde brillante lactarobili Agar Mc Conkey Agar nutritivo Agar para cuenta estándar Calda lauril con MUG Reactivo de VP Calda EC Solución buffer pH4 Solución buffer pH7			
Incubación de la muestra			
	Medio	Temperatura de incubación 35°C 37°C 44°C ± 1°C	Tiempo de incubación 18 h 24 h
Invertir las cajas en incubación a:			Almacenamiento en refrigeración 4°C antes del cuantificación
			Si No Tiempo (h)
Control de calidad			
Control en soluciones dilutas	Tamaño de la muestra 94 / 9.2 (mL)	Soluciones dilutas Muestra 10mL 1mL 0.1mL	Criterios de aceptación Aceptada Rechazada
Control de exactitud en medir:			
Aceptada	X	---	X X X ---
Rechazada			
Control del ambiente del área de siembra:			
Aceptada	X	---	X X X ---
Rechazada			
Parities E. coli ATCC 25922			
Control parities - negativo en medir de cultivos:			
ADECHADO	---	ADECHADO ADECHADO ADECHADO	---
		Negativo S. aureus ATCC 25923	

GESDOC - COPIA CONTROLADA

Bibliografía

- Álvarez Ospina, N., & Gómez Murillo, E. (2014). Documentación del Sistema de Gestión de la Calidad (SGC) basado en la norma NTC 9001:2008 en la Fundación Yolanda Turizo . Ingeniería industrial, 1-32.
- García, M. P., Quispe, C. A., & Ráez, L. G. (2003). Mejora continua de la calidad en los procesos. Industrial data, 89-94.
- González Moralejo, A. (2007). Protocolo de actuación en el diseño de un sistema de trazabilidad para la industria alimentaria. Agroalimentaria, 63-84.
- Gutierrez Pulido, H. (2010). Clidad total y Productividad. McGraw-Hill/Interamericana,S.A de C.V., 115-127.
- María Luisa Camaró-Salaa, R. M.-G.-M. (2013). Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. ELSERVIER, 2,3,4,.
- Martinez Morales , V. (2006). Criterios para la acreditación de laboratorios que realizan ensayos microbiológicos según NC-ISO/IEC. CENIC. Ciencias Biológicas, vol. 37, núm. 1,, 2,3.
- Paez, L. J. (2008). Validacion secundaria del metodo de filtracion por membraba para la deteccion de coliformes totales y Escherichia coli en muestras de agua para consumo humano . Pontifica Uiversidad Javeriana Fcultad de Cencias , 18-19-20.
- Peresson, L. (2007). Sistema de Gestión de la Calidad con enfoque al cliente. Uva, 1-116.
- salud, S. d. (2014). objeto establecer los métodos generales y alternativos de prueba para la determinación de los siguientes indicadores microbianos y patógenos en alimentos, bebidas y agua para uso y consumo humano. Ciudad de México.: Secretaria de salud.
- NOM-210-SSA1-2014, Apéndice H Normativo. 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.
- NOM-112-SSA1-1995. Determinación de coliformes totales por número más probable NMP