

NOTA IMPORTANTE:

La entidad sólo puede hacer uso de esta norma para si misma, por lo que este documento NO puede ser reproducido, ni almacenado, ni transmitido, en forma electrónica, fotocopia, grabación o cualquier otra tecnología, fuera de su propio marco.

ININ/ Oficina Nacional de Normalización

MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO Y ANIMAL. GUIA GENERAL PARA LA ENUMERACION DE COLIFORMES. TECNICA DEL NUMERO MAS PROBABLE (ISO 4831:1991, IDT)

Microbiology of food and animal of feeding stuffs. General guidance
for enumeration of coliforms. Most probable number technique

ICS: 07.100.30

1. Edición

Diciembre 2002

REPRODUCCION PROHIBIDA

Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 Vedado, Ciudad de La Habana.
Teléf.: 830-0835 Fax: (537) 33-8048 E-mail: nc@ncnorma.cu

Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC), es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba que representa al país ante las Organizaciones Internacionales y Regionales de Normalización.

La preparación de las Normas Cubanas se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. La aprobación de las Normas Cubanas es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en evidencias de consenso.

Esta Norma Cubana:

- Ha sido elaborada, por el NC/CTN No. 61 de Microbiología, integrado por las siguientes Instituciones:
 - Ministerio de Salud Pública (UNSA)
 - Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos (INHA-MINSAP)
 - Centro Nacional de Higiene de los Alimentos (IMV-MINAGRI)
 - Instituto de Investigaciones de la Industria Alimenticia (IIIA-MINAL)
 - Centro Nacional de Inspección de la Calidad (CNICA-MINAL)
 - Laboratorio Cuba-Control S.A (MINCEX)
 - Instituto de Farmacia y Alimentos (UH-MES)
 - Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología (CPHE-MINSAP)
 - Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP- MIP)
 - Ministerio de Comercio Interior
 - Instituto de Investigaciones en Normalización (ININ-ONN)
 - Oficina Nacional de Normalización (ONN)
- Es una adopción idéntica por el método de traducción de la versión en inglés de la ISO 4831: 1991 *Microbiology. General guidance for enumeration of coliforms. Most probable number technique.*

Con independencia de la existencia de normas ISO para productos específicos, la NC-ISO 4831 se aplicará para todos los alimentos para consumo humano y de animales.

- Sustituye a la NC 76-04-4: 82: Productos alimenticios y bebidas. Métodos de ensayo microbiológicos. Determinación del número más probable de microorganismos coliformes.

© NC, 2002

Todos los derechos reservados. A menos que se especifique, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada por alguna forma o medios electrónicos o mecánicos, incluyendo las fotocopias o microfilmes, sin el permiso previo escrito de:

Oficina Nacional de Normalización (NC).

Calle E No. 261 Ciudad de La Habana, Habana 3. Cuba.

Impreso en Cuba

MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO Y ANIMAL. GUIA GENERAL PARA LA ENUMERACION DE COLIFORMES. TECNICA DEL NUMERO MAS PROBABLE

1 Objeto

Esta norma cubana establece el método de análisis microbiológico para la determinación cuantitativa de coliformes presentes en productos destinados para el consumo humano y animal, por el método del número más probable, después de incubar a 37°C en un medio líquido. La temperatura a emplear se establece en acuerdo con las partes implicadas.

NOTA: La temperatura de incubación de 30°C se empleará cuando el objetivo de la enumeración este relacionado con procesos tecnológicos; la temperatura de 35°C ó 37°C se utilizará cuando el objetivo de la enumeración guarde más relación con el campo de la salud pública.

Una limitación en la aplicación de la norma está dada por la susceptibilidad de los métodos que ofrecen un alto grado de variabilidad. El método debe ser aplicado y los resultados interpretados según la información que se da en 10.4.

2 Referencias normativas

Las siguientes normas contienen disposiciones que, al ser citadas en este texto, constituyen disposiciones de esta Norma Cubana. Las ediciones indicadas estaban en vigencia en el momento de esta publicación. Como toda norma está sujeta a revisión, se recomienda a aquellos que realicen acuerdos sobre la base de ellas que analicen la conveniencia de usar las ediciones más recientes de las normas citadas seguidamente. La Oficina Nacional de Normalización posee en todo momento la información sobre las normas internacionales, regionales y cubanas en vigencia.

NC ISO 6887-1: 2002 *Microbiología de alimentos de consumo humano y animal – Preparación de la muestra de ensayo, la suspensión inicial y las diluciones decimales para pruebas microbiológicas. Parte 1: Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales.*

ISO 7218: 1996 *Microbiology – General instructions for microbiological examinations.*

NC 38-02-13: 1991 *SNSA Determinación de Salmonella. Método ensayo microbiológico.*

3 Definición

Para los propósitos de esta norma se aplica la siguiente definición.

Coliformes: Bacterias las cuales a la temperatura especificada (30°C, 35°C ó 37°C según lo acordado) causan fermentación de la lactosa con producción de gas, bajo las condiciones de prueba especificadas en esta norma.

4 Principio

4.1 Inoculación de 3 tubos de medio líquido de enriquecimiento selectivo de doble fuerza [ver 5.3 a)] con una cantidad específica de la muestra de prueba si el producto inicial es líquido o con una cantidad específica de una suspensión inicial en el caso de otros productos.

4.2 Inoculación de 3 tubos de medio líquido de enriquecimiento selectivo de simple fuerza [ver 5.3 b)] con una cantidad específica de la muestra de prueba si el producto inicial es líquido o con una cantidad específica de una suspensión inicial en el caso de otros productos.

Bajo las mismas condiciones inocule 3 tubos más del medio (5.3. b) con las diluciones decimales de la muestra o de la suspensión inicial.

4.3 Incubación a 30 °C, 35 °C ó 37 °C (según lo acordado) de los tubos conteniendo el medio de doble fuerza [5.3 a)] por 24h y de los tubos conteniendo el medio simple fuerza [5.3 b)] por 24 a 48h y examen de estos tubos.

4.4 Inoculación de una serie de tubos del medio de confirmación (5.4) con los cultivos de los tubos del medio 5.3 a) y con aquellos cultivos de las primeras series de tubos de medio 5.3 b) en el cual ha sido notada turbidez o formación de gas.

4.5 Incubación a 30 °C, 35 °C ó 37 °C (según lo acordado) por 24 h a 48 h y examen de las nuevas series de tubos (4.4).

4.6 Cálculo del número más probable de coliformes por mililitros por gramos de muestra (NMP) utilizando una tabla para la determinación de números más probables, a partir del número de tubos en las nuevas series (4.5) que muestren formación de gas.

5 Medio de cultivo y dilución

5.1 General (Ver ISO 7218)

5.2 Dilución (Ver NC ISO 6887-1)

5.3 Caldo triptosa lauril sulfato (medio selectivo de enriquecimiento)

Composición:

	a) Medio de doble fuerza	b) Medio simple fuerza
Tryptosa	40 g	20 g
Lactosa	10 g	5 g
Hidrógeno fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	5.5 g	2.75 g
Dihidrógeno fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	5.5 g	2.75 g
Cloruro de Sodio (NaCl)	10 g	5 g
Lauril sulfato de sodio	0.2 g	0.1 g
Agua destilada	1000 mL	1000 mL

Preparación:

- ◆ Disolver los componentes o el medio completo deshidratado en el agua, calentar si es necesario.
- ◆ Ajustar el pH, si es necesario, tal que después de esterilizar sea 6.8 a 25°C.

- ◆ En el caso del medio de simple fuerza, dispensar 10 mL en tubos de dimensiones de 16mm x 160mm (6.4) conteniendo tubos Durham (6.5) y en el caso del medio de doble fuerza utilizar tubos de 20mm x 200mm (6.4) [los tubos no contienen los tubos Durham (6.5)]
- ◆ Esterilizar en autoclave a 121°C por 15min.

Los tubos Durham no deben contener burbujas de aire después de la esterilización.

5.4 Caldo lactosa bilis verde brillante (medio de confirmación):

Composición :

Peptona	10 g
Lactosa	10 g
Bilis de Buey deshidratada	20 g
Verde brillante ¹	0.0133 g
Agua destilada	1000 mL

Preparación :

- ◆ Disuelva los componentes o el medio completo deshidratado en el agua. Caliente si es necesario.
- ◆ Ajuste el pH de ser necesario para que después de la esterilización este sea igual a 7.2 a 25°C.
- ◆ Dispense 10 mL de medio en tubos de ensayo de 16mm x160mm (6.4), conteniendo tubos Durham (6.5).
- ◆ Esterilice en autoclave a 121°C por 15 min.
- ◆ Los tubos Durham no deben contener burbujas de aire después de la esterilización.

NOTA 2: Es necesario chequear el medio antes de su uso porque podría no siempre ofrecer los resultados esperados.

6 Aparatos y utensilios

Aparatos usuales en el laboratorio de microbiología, y en particular los siguientes:

6.1 Aparato para esterilización seca (horno) o para esterilización húmeda (autoclave).
(Ver ISO 7218)

6.2 Incubadoras capaces de operar a temperatura de (30±1) °C, (35±1) °C ó (37±1) °C.

6.3 Asas de níquel-cromo aproximadamente de 3 mm de diámetro

6.4 Tubos de cultivo de aproximadamente 16 mm x 160 mm de y 20 mm x 200 mm.

6.5 Tubos de Durham dimensión 6 mm x 50 mm

6.6 Pipetas graduadas con capacidad de 10 mL y 1 mL.

¹ Correspondiente a las especificaciones expresadas en ISO 6579:2002 Anexo C

6.7 Medidor de pH

6.8 Homogenizador con vaso esterilizable u homogenizador peristáltico.

7 Muestreo

Utilice un muestreo de acuerdo con una norma nacional o internacional establecida para el producto en cuestión.

Si no existe una norma nacional o internacional se recomienda que se realice el muestreo de acuerdo entre partes.

8 Preparación de la muestra de ensayo.

Prepare la muestra de ensayo de acuerdo con la norma específica para el producto en cuestión. Si no existe una norma específica se recomienda que se realice la preparación de la muestra de acuerdo entre las partes.

9. Procedimiento (ver diagrama en anexo A)

Cuando algunas muestras del mismo lote son tomadas para ser examinadas, llevar a cabo las siguientes operaciones para cada muestra.

9.1 Porción de ensayo, suspensión inicial y diluciones

Ver NC ISO 6887-1 y la norma específica para el producto en cuestión.

Prepare suficiente número de diluciones para asegurar que todos los tubos correspondientes a la dilución final deberán ofrecer un resultado negativo.

9.2. Inoculación ²⁾ e incubación

9.2.1 Tome 3 tubos del medio de enriquecimiento selectivo de doble fuerza [5.3 a)], usando una pipeta estéril (6.6), transfiera para cada uno de esos tubos 10 mL de la muestra, si es líquida, ó 10 mL de la suspensión inicial, en el caso de otros productos.

9.2.2 Tome 3 tubos del medio de enriquecimiento selectivo de simple fuerza [5.3 b)], usando una pipeta estéril (6.6), transfiera para cada uno de esos tubos 1 mL de la muestra, si es líquida, ó 1 mL de la suspensión inicial, en el caso de otros productos.

9.2.3 Para cada uno de las nuevas diluciones (desde 10^{-1} ó 10^{-2} , acorde a la muestra de prueba), continúe como se describe en 9.2.2. Utilice 1 pipeta estéril para cada dilución. Mezcle cuidadosamente el inóculo y el medio.

²⁾ En el documento se indican combinaciones de tres tubos para cada serie de dilución, pero si se requiere mayor seguridad en los resultados puede ser necesario utilizar series de cinco tubos (Ver tabla B.2)

9.2.4 Coloque los tubos de medio de enriquecimiento selectivo de doble fuerza (9.2.1) en la incubadora (6.2) a 30 °C, 35 °C ó 37 °C (según lo acordado) por 24 h ± 2 h.

9.2.5 Coloque los tubos de medio de enriquecimiento selectivo de simple fuerza (9.2.2 y 9.2.3) en la incubadora (6.2) a 30 °C, 35 °C ó 37°C (según lo acordado) por 24 h ± 2 h, sino no aparece formación de gas u opacidad se mantiene incubando por 24 horas más.

9.3 Confirmación

9.3.1 A partir de cada uno de los tubos incubados desde 9.2.4 inocule con un asa (6.3) un tubo con medio confirmación (5.4). Incube a 30 °C, 35 °C ó 37°C (según lo acordado) por 24 h ± 2 h, sino no aparece formación de gas u opacidad mantenga incubando por 24 horas más.

9.3.2 Siga el mismo procedimiento para los tubos incubados desde 9.2.5, que muestren formación de gas u opacidad.

9.4 Interpretación

Para cada dilución, contar el número total de tubos en el cual se observó formación de gas en 9.3 (tubos positivos) después de 24 h ± 2 h y hasta 48 h ± 2 h si fue necesario.

10. Expresión de los resultados

10.1 Selección de diluciones⁽³⁾

Para cada muestra examinada, seleccione 3 diluciones consecutivas acorde con uno de los 3 casos siguientes:

10.1.1 Caso 1-AI menos una dilución ofrece 3 tubos positivos

Seleccione la dilución más alta (es la que tiene menor concentración de la muestra), donde aparece 3 tubos positivos, seguido con las próximas 2 diluciones más altas (aquellas que tienen concentraciones de la muestra de 1/10 y 1/100 de la primera dilución seleccionada) (ver tabla 1 ejemplo 1).

Ver también 10.1.3.

Si se hicieron suficientes diluciones nuevas más allá de la dilución más alta brindando tres tubos positivos, seleccione las tres diluciones más altas en las series (aquellas que tengan la concentración de muestra más baja) (ver tabla 1 ejemplo 2).

³ En esta subcláusula, la suspensión inicial y, si es necesario, la muestra de prueba son consideradas como diluciones

10.1.2 Caso 2- Diluciones que no muestren tres tubos positivos

El caso 1 no puede ser aplicado. Seleccione las tres diluciones más altas en las series (aquellas que tengan la concentración de muestra más baja) entre las cuales al menos un resultado positivo fue obtenido (ver tabla 1 ejemplo 3)

Ver también 10.1.3.

10.1.3 Casos especiales

En todos los casos donde más de una de las tres diluciones seleccionadas acorde con 10.1.1y 10.1.2 no mostraron tubos positivos, seleccionar de esas diluciones la más baja que no mostró tubos positivos (la que tiene mayor concentración de la muestra) y las dos siguientes diluciones

menores en las series (aquellas que tienen concentraciones de la muestra de 10 y 100 veces de la primera dilución seleccionada (ver tabla 1, ejemplo 4 y 5), excepto cuando los tubos positivos son solamente encontrados al nivel de la primera dilución preparada de la muestra en este último caso. Si es necesario seleccionar las primeras tres diluciones para el cálculo del NMP siempre que estas series incluyan dos diluciones mostrando tubos negativos.

Ver los ejemplos que se brindan en la tabla 1

Tabla 1— Ejemplos de la selección de resultados positivos para el cálculo del NMP.

Ejemplo	No. de tubos positivos obtenidos de tres tubos incubados de las siguientes cantidades de muestra inoculadas por tubo ¹⁾						NMP ²⁾	
	Productos líquidos	10mL	1mL	10 ⁻¹ mL	10 ⁻² mL	10 ⁻³ mL	Productos líquidos	Otros productos
	Otros productos	1g	10 ⁻¹ g	10 ⁻² g	10 ⁻³ g	10 ⁻⁴ g	mL ⁻¹	g ⁻¹
1		3	3	2	1	0	1.5 x 10	1.5 x 10 ²
2		3	3	3	0		2.4 x 10	2.4 x 10 ²
3		2	2	1	1	0	7.4	7.4 x 10
4		3	3	0	0	0	2.4	2.4 x 10
5		2	2	0	1	0	2.1 x 10	2.1

1) _____, combinación seleccionada.
 2) Calculado usando NMP índice para tres tubos (tabla B.1)

10.2 Determinación del índice de NMP

10.2.1 Acorde al número de muestras examinadas por lotes, chequear, usando la tabla B.1 o la tabla B.2, según las secuencias de números de tubos positivos correspondientes a las diluciones seleccionadas de acuerdo con 10.1 que sean estadísticamente aceptables. La aceptabilidad depende de los números de muestras examinadas y de la precisión y la decisión o no para aceptar los resultados de categoría 2.

Por ejemplo si solamente resultados de categoría 1 son aceptados, la secuencia 221 es aceptable solo cuando 10 muestras (del lote concerniente) han sido examinadas, sin embargo si los resultados menos probable de la categoría 2 son también aceptados, la secuencia 221 es también aceptable cuando solo 2,3 ó 5 muestras han sido examinadas. Sin embargo cuando la secuencia 221 es el resultado de una simple prueba nunca es aceptable.

10.2.2 Cada secuencia se encuentra aceptable acorde con 10.2.1 al obtener el NMP índice de la tabla B.1 , B.2.

10.3 Cálculo del número más probable (NMP)

Obtener el número de coliformes por mL o por g a multiplicar el NMP índice (Ver 10.2) por el recíproco de la menor dilución seleccionada (que es la que tiene mayor concentración de la muestra). Cuando la menor dilución seleccionada corresponde a los tubos preparados con el medio a doble fuerza (inoculación con 10 mL) primero divida el NMP índice por 10. Exprese los resultados como un número entre 1.0 y 9.9 multiplicado por 10^x , donde x es la potencia adecuada de 10.

10.4 Precisión

Es reconocido que puede existir amplias variaciones en los resultados obtenidos con la técnica de NMP, por tanto los resultados deben ser utilizados con precaución. Los límites de confianza vienen dado en las tablas B.1y B.2.

Ejemplo:

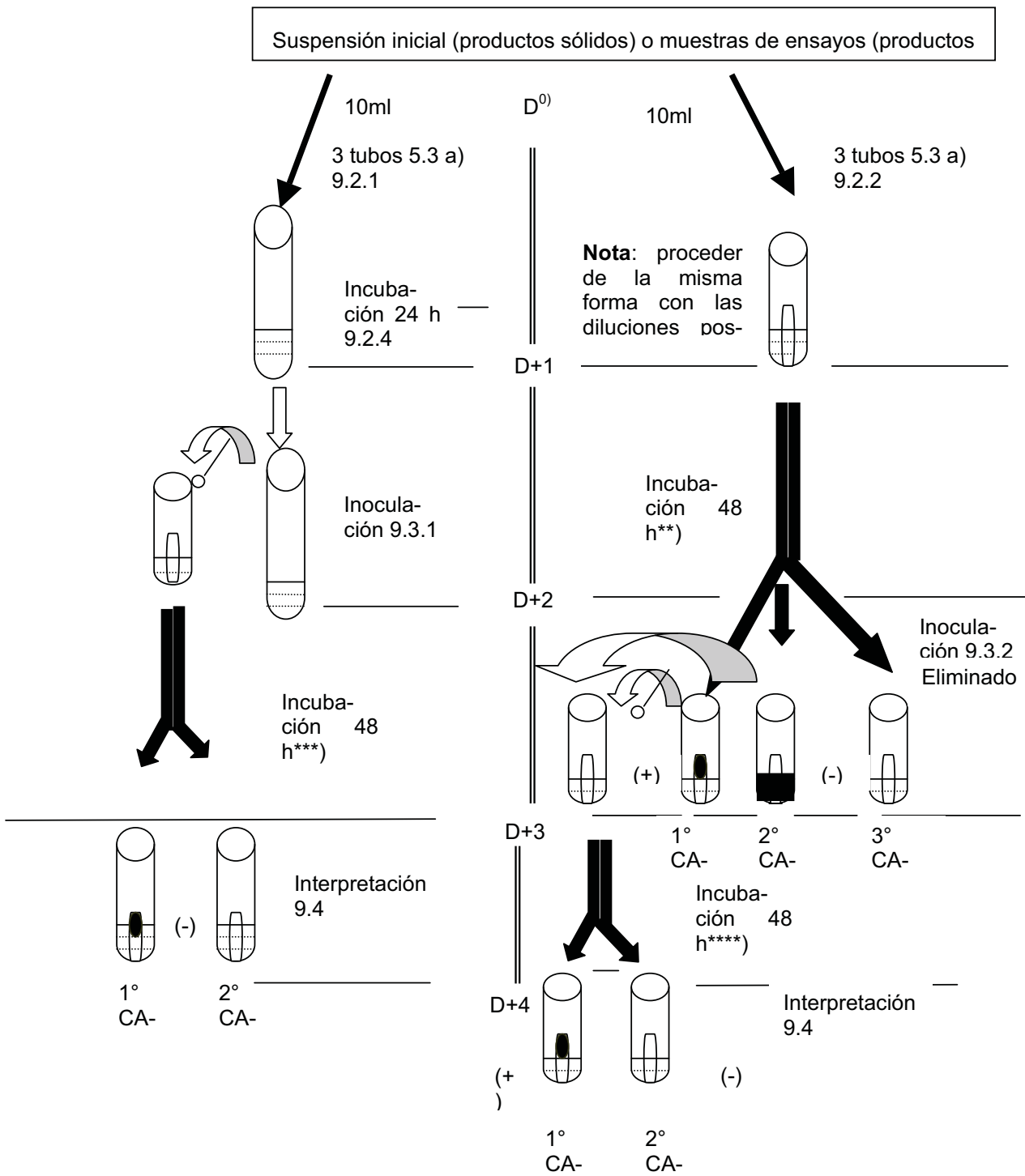
Para una muestra sólida en el 95% de los casos, los límites de confianza varían desde 13 hasta 200 coliformes por gramo para un NMP de 7.4×10^1 coliformes/ g y desde 4 hasta 99 coliformes/ g para un NMP de 2.4×10^1 coliformes/g.

11 Informe de ensayo

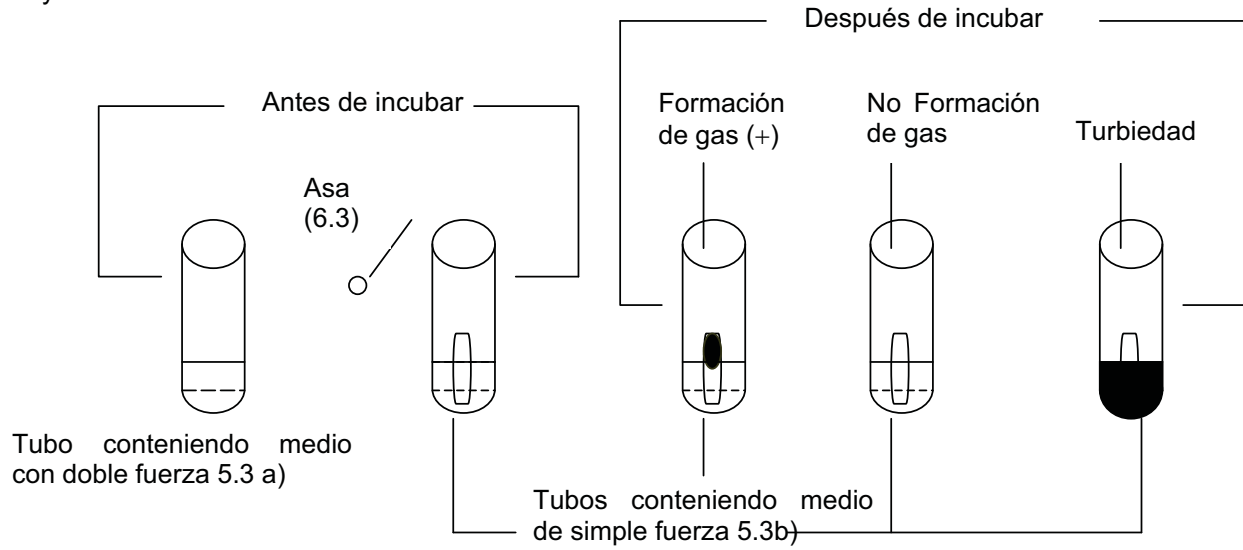
Debe especificar el método usado, el objetivo de la prueba (tecnológica o salud pública) y la temperatura seleccionada y los resultados obtenidos. Debe también hacer mención en detalles de las operaciones que no están especificada en este Norma Internacional o que se ofrecen como opción. Además debe incorporarse los detalles de cualquier incidente que puede tener influencia en los resultados.

Este informe debe incluir toda la información necesaria para la completa identificación de la muestra.

Anexo A
(informativo)



Leyenda:



*) D= día

**) o posible 24h (ver 9.2.5)

***) o posible 24h (ver 9.3.1)

****) o posible 24h (ver 9.3.2)