
NORMA CUBANA

NC

ISO 7937: 2012
(Publicada por la ISO en 2004)

MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO Y ANIMAL—MÉTODO HORIZONTAL PARA LA ENUMERACIÓN DE *Clostridium perfringens*—TÉCNICA DE CONTEO DE COLONIAS (ISO 7937: 2004, IDT)

Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens*—Colony-count technique

ICS: 07.100.32

1. Edición Diciembre 2012
REPRODUCCIÓN PROHIBIDA

Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 El Vedado, La Habana. Cuba.
Teléfono: 830-0835 Fax: (537) 836-8048; Correo electrónico: nc@ncnorma.cu; Sitio
Web: www.nc.cubaindustria.cu



Cuban National Bureau of Standards

Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC), es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba y representa al país ante las organizaciones internacionales y regionales de normalización.

La elaboración de las Normas Cubanas y otros documentos normativos relacionados se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. Su aprobación es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en las evidencias del consenso.

Esta Norma Cubana:

- Ha sido elaborada, por el Comité Técnico de Normalización NC/CTN 61 de Microbiología de los Alimentos, integrado por representantes de las siguientes entidades:
 - Ministerio de Salud Pública. Dirección Nacional de Salud Ambiental (DNSA)
 - Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos (INHA-MINSAP)
 - Centro Nacional de Higiene de los Alimentos (IMVMINAGRI)
 - Centro Nacional de Inspección de la Calidad (CNICAMINAL)
 - Laboratorio de Cuba-Control S.A. (MINCEX)
 - Oficina Nacional de Normalización (ONN)
 - Instituto de Farmacia y Alimentos (UH-MES)
 - Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA-MES)
 - Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP-MINAL)
 - Laboratorio Central de Calidad (CID-CI. MINCIN)
 - Escuela de Hotelería y Turismo (MINTUR)
 - Instituto de Investigaciones de la Industria Alimenticia (IIIA-MINAL)
 - Centro Nacional de Biopreparados (BIOCEN-CITMA)
- Es una adopción idéntica por el método de traducción de la Norma Internacional ISO 7937:2004 *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of Clostridium perfringens — Colony-count technique*.
- Sustituye a la NC 38-02-11: 1988 Sistema de Normas Sanitarias de Alimentos – Determinación cuantitativa de *clostridium perfringens*. Método de análisis microbiológico.

© NC, 2012

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

Oficina Nacional de Normalización (NC)

Calle E No. 261, Vedado, Ciudad de La Habana, Habana 4, Cuba.

Impreso en Cuba.

Índice

0	Introducción.....	4
1	Objeto	5
2	Referencias normativas	5
3	Términos y definiciones.....	6
4	Principio	6
5	Diluentes, medios de cultivo y reactivos	6
6	Aparatos y cristalería.....	11
7	Toma de muestra	12
9	Procedimiento	12
10	Expresión de los resultados	15
11	Reporte del análisis	17
	Anexo A (Informativo).....	18
	Resultados del estudio interlaboratorio.....	18
	Bibliografía.....	22

0 Introducción

0.1 Debido a la gran variedad de alimentos para alimentación humana y animal, puede que este método horizontal no resulte adecuado en todos los detalles, para algunos productos. En tal caso se pueden utilizar otros métodos diferentes, específicos para estos productos si resulta absolutamente necesario por razones técnicas justificadas. No obstante, se debería intentar por todos los medios aplicar este método horizontal en todo lo posible.

0.2 En la próxima revisión de esta Norma Cubana, se tendrá en cuenta toda la información disponible en ese momento sobre el grado de seguimiento de este método horizontal y las razones para desviarse de este método en curso de productos concretos.

0.3 La armonización de métodos de análisis no puede ser inmediata y, para ciertos grupos de productos, puede haber normas internacionales o nacionales que no cumplen con este método horizontal. Es de esperar que cuando dichas normas se revisen, se modifiquen para cumplir con esta Norma Cubana para que llegue un momento donde sólo existan desviaciones a este método, necesarias por razones técnicas bien justificadas.

MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO Y ANIMAL—MÉTODO HORIZONTAL PARA LA ENUMERACIÓN DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*— TÉCNICA DE CONTEO DE COLONIAS

1 Objeto

Esta Norma Cubana describe un método horizontal para el recuento de *Clostridium perfringens* viables. Es aplicable a:

- Los productos para consumo humano o animal, y
- Las muestras ambientales en el área de producción y manipulación de alimentos.

2 Referencias normativas

Las normas que a continuación se indican son indispensables para la aplicación de esta norma. Para las referencias con fecha, solo se aplica la edición citada. Para las referencias sin fecha se aplica a la última edición de la norma (incluyendo cualquier modificación de esta)

- ISO 6887-1- *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y las diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 1: Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales.*
- ISO 6887-2- *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de análisis, suspensión inicial y las diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 2: Reglas específicas para la preparación de carne y productos cárnicos.*
- ISO 6887-3- *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de análisis, suspensión inicial y las diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 3: Reglas específicas para la preparación de pescado y productos de la pesca.*
- ISO 6887-4- *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de análisis, suspensión inicial y las diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 4: Reglas específicas para la preparación de productos distintos a leche y productos lácteos, carne y productos cárnicos y pescado y productos de la pesca.*
- NC-ISO 7218 - *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Reglas generales para los exámenes microbiológicos.*
- ISO 8261 - *Leche y productos lácteos. Directrices generales para la preparación de las muestras de análisis, suspensiones iniciales y diluciones decimales para el examen microbiológico.*
- NC-ISO 11133-1- *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Guía para la preparación y producción de medios de cultivo. Parte 1: Guías generales en el aseguramiento de la calidad para la preparación de medios de cultivo en el laboratorio.*

- NC-ISO 11133-2- *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Guía para la preparación y producción de medios de cultivo. Parte 2: Guías prácticas para las pruebas de desempeño de los medios de cultivo.*

3 Términos y definiciones

Para los propósitos de esta Norma Cubana se aplican los siguientes términos y definiciones

3.1 *Clostridium perfringens*

***C. perfringens*:**

Bacterias que forman colonias características (precipitado negro, causado por la reducción del sulfito a sulfuro, que colorea las colonias de negro) en el medio selectivo especificado y que dan reacciones de confirmación positivas cuando las pruebas se realizan por alguna de las dos técnicas especificadas en esta norma.

3.2 Enumeración de *C. perfringens*:

Determinación del número de bacterias *Clostridium perfringens* por mililitro o por gramo de muestra cultivables y confirmadas cuando el análisis se realiza según el método especificado en esta norma.

4 Principio

4.1 Se inoculan las placas Petri con una cantidad determinada de la muestra para análisis si el producto es líquido o empleando una cantidad determinada de una suspensión inicial en el caso de otros productos.

Se inoculan otras placas Petri, bajo las mismas condiciones, empleando diluciones decimales de la muestra o de la suspensión inicial.

Se añade un medio selectivo (por placa vertida) y después una capa de recubrimiento del mismo medio.

4.2 Las placas se incuban en anaerobiosis a 37 °C durante 20 h ± 2 h.

4.3 Se cuentan las colonias características.

4.4 Se confirman las colonias características y se calcula el número de *C. perfringens* por mililitro o por gramo de muestra.

5 Diluentes, medios de cultivo y reactivos

Véanse las Normas NC-ISO 7218, NC-ISO 11133-1 y NC-ISO 11133-2 para la preparación, producción y evaluación del desempeño de los medios de cultivo.

5.1 Diluyente

Véase el apartado adecuado de la Norma ISO 6887 o de la ISO 8261.

5.2 Agar sulfito-cicloserina (SC)

NOTA Este medio fue denominado originariamente como "TSC sin yema de huevo" (véase [1]).

5.2.1 Medio base

5.2.1.1 Composición

Digerido enzimático de proteína	15,0 g
Digerido enzimático de soja	5,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Disulfito disódico (Na ₂ S ₂ O ₅) anhidro	1,0 g
Citrato amónico de hierro (III) ^a	1,0 g
Agar	9,0 g a 18,0 g ^b
Agua	1 000 ml
^a Este reactivo debería contener al menos el 15 % (m/m) de hierro	
^b Dependiendo de la capacidad de gelificación del agar	

5.2.1.2 Preparación

Se disuelven los componentes en el agua mediante ebullición. Se ajusta el pH de manera que después de la esterilización sea de $7,6 \pm 0,2$ a 25 °C. Se distribuye el medio base en erlenmeyers o frascos de capacidad adecuada. Se esteriliza durante 15 min a 121 °C. Se almacena en refrigeración a $5 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$. El medio no utilizado se desechará dos semanas después de haber sido preparado.

En ciertas ocasiones (véase el apartado 9.4.3.1) puede ser necesario preparar placas de medio base de agar SC para la confirmación con el medio nitrato-movilidad (5.5) y el medio lactosa-gelatina (5.8). Para realizar esto, se reparten alícuotas de unos 15 ml de medio base [fundido y enfriado hasta aproximadamente 44 °C a 47 °C empleando un baño de agua (6.10)] en placas Petri y se dejan solidificar. Las placas deben ser secadas inmediatamente antes de ser utilizadas (véase la Norma NC-ISO 7218).

5.2.2 Solución de D-cicloserina

5.2.2.1 Composición

D-Cicloserina ^a	4,0 g
Agua	100 ml
^a Se utilizará exclusivamente el polvo blanco cristalino	

5.2.2.2 Preparación

Disolver la D-cicloserina en el agua y esterilizar mediante filtración.

Almacenar en nevera a $3 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$.

La solución no utilizada se desechará cuatro semanas después de haber sido preparada.

5.2.3 Medio completo

Inmediatamente antes de ejecutar el método de siembra por placa vertida (véase el apartado 9.2), adicione 1 ml de la solución de D-cicloserina (5.2.2) por cada 100 ml de medio base (5.2.1) fundido estéril y enfriado de 44 °C a 47 °C.

5.2.4 Estudio del desempeño para el aseguramiento de la calidad del medio SC

Para la definición de selectividad y productividad se puede consultar NC-ISO 11133-1. Para comprobar el desempeño se puede consultar la tabla B.1 [véase TS(C)] de la Norma NC-ISO 11133-2: 2011.

5.3 Medio tioglicolato líquido

5.3.1 Composición

Digerido enzimático de caseína	15,0 g
L-Cisteína	0,5 g
D-Glucosa	5,5 g
Extracto de levadura	5,0 g
Cloruro sódico	2,5 g
Tioglicolato sódico (mercaptoacetato)	0,5 g
Agar	0,5 g a 2,0 g ^a
Resazurina	0,001 g
Agua	1 000 ml

^a Dependiendo de la capacidad de gelificación del agar.

5.3.2 Preparación

Se disuelven los componentes en el agua mediante ebullición. Se ajusta el pH de manera que después de la esterilización sea de $7,1 \pm 0,2$ a 25 °C.

Se reparten alícuotas de 10 ml en tubos y se esteriliza a 121 °C durante 15 min.

Antes de ser utilizado este medio debe desgasificarse.

5.3.3 Estudio del desempeño para el aseguramiento de la calidad del caldo tioglicolato.

Para la definición de la selectividad y la productividad se puede consultar la Norma NC-ISO 11133-1. Para estudiar el rendimiento se puede consultar la tabla B.4 de la Norma NC-ISO 11133-2:2011.

5.4 Medio lactosa sulfito (LS) (opcional)

5.4.1 Medio base

5.4.1.1 Composición

Digerido enzimático de caseína	5,0 g
Extracto de levadura	2,5 g
Cloruro sódico	2,5 g
Lactosa	10 g
Hidrocloruro de L-cisteína	0,3 g
Agua	1 000 ml

5.4.1.2 Preparación

Disolver los componentes en el agua mediante ebullición (si fuera necesario). Ajustar el pH de manera que después de la esterilización sea de $7,1 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Repartir alícuotas de 8 ml en tubos con tubos Durham invertidos (6.7) y se esteriliza a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min.

El medio puede almacenarse a $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un tiempo de hasta 4 semanas.

5.4.2 Solución de disulfito disódico

5.4.2.1 Composición

Disulfito disódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) anhidro	1,2 g
Agua	100 ml

5.4.2.2 Preparación

Se disuelve el disulfito disódico en el agua y se esteriliza mediante filtración.

La solución deberá utilizarse el mismo día de su preparación.

5.4.3 Solución de citrato amónico de hierro (III)

5.4.3.1 Composición

Citrato amónico de hierro (III)	1 g
Agua	100 ml

5.4.3.2 Preparación

Se disuelve el citrato amónico de hierro (III) en el agua y se esteriliza mediante filtración.

La solución deberá utilizarse el mismo día de su preparación

5.4.4 Medio completo

Si el medio base no va a utilizarse el mismo día de su preparación, inmediatamente antes de completarse se desgasificará mediante calentamiento seguido de enfriamiento rápido. Si está en tubos con tapas de rosca, se aflojarán las tapas antes del calentamiento y se apretarán antes del enfriamiento.

A continuación se añaden 0,5 ml de la solución de disulfito disódico (5.4.2) y 0,5 ml de citrato de hierro (III) (5.4.3) por cada 8 ml de medio base (5.4.1).

Se emplea el medio completo en el día de su preparación.

5.5 Medio nitrato movilidad (opcional)

5.5.1 Composición

Digerido enzimático de caseína	5,0 g
Extracto de carne	3,0 g
Galactosa	5,0 g
Glicerol	5,0 g
Nitrato potásico (KNO ₃)	1,0 g
Hidrógeno ortofosfato disódico (Na ₂ HPO ₄)	2,5 g
Agar	1,0 g a 5,0 g ^a
Agua	1 000 ml
^a Dependiendo de la capacidad de gelificación del agar.	

5.5.2 Preparación

Disolver los componentes en el agua mediante ebullición. Ajuste el pH de manera que después de la esterilización sea de $7,3 \pm 0,2$ a 25 °C.

Repartir en tubos de cultivo alícuotas de 10 ml y esterilizar a 121 °C durante 15 min. Si no va a utilizarse en el mismo día de su preparación, guardar en nevera a $5 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$. Inmediatamente antes de su uso, calentar en agua en ebullición o en corriente de vapor durante 15 min. y a continuación enfriar rápidamente hasta la temperatura de incubación.

El medio no utilizado se desechará 4 semanas después de haber sido preparado.

5.6 Reactivo de detección de nitritos (opcional)

5.6.1 Solución de ácido 5-amino-2-naftalenosulfónico (5-2-ANSA)

Se disuelven 0,1 g de 5-2-ANSA en 100 ml de una solución al 15% (V/V) de ácido acético. Se filtra a través de papel de filtro.

Se almacena en frasco de color ámbar bien cerrado (preferiblemente con gotero) a $5 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$.

5.6.2 Solución de ácido sulfanílico

Se disuelven 0,4 g de ácido sulfanílico en 100 ml de una solución al 15% (V/V) de ácido acético. Se filtra a través de papel de filtro.

Se almacena en frasco de color ámbar bien cerrado (preferiblemente con gotero) a $5 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$.

5.6.3 Preparación del reactivo completo

Se mezclan volúmenes iguales de las dos soluciones (5.6.1 y 5.6.2) inmediatamente antes de utilizarse. El reactivo no utilizado se desechará inmediatamente.

5.7 Polvo de zinc (opcional)

5.8 Medio lactosa-gelatina (opcional)

5.8.1 Composición

Digerido enzimático de caseína	15,0 g
Extracto de lavadura	10,0 g
Lactosa	10,0 g
Gelatina	120,0 g
Rojo fenol	0,05 g
Agua	1 000 ml

5.8.2 Preparación

Se disuelven los componentes, exceptuando la lactosa y el rojo fenol en el agua. Se ajusta el pH de manera que después de la esterilización sea de $7,5 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

Se añade la lactosa y el rojo fenol, se reparten en tubos de ensayo alícuotas de 10 ml y se esteriliza a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. Si no va a utilizarse en el mismo día de su preparación, se guardará en nevera a $5^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Inmediatamente antes de su uso, se calienta en agua en ebullición o en corriente de vapor durante 15 min y a continuación se enfría rápidamente hasta la temperatura de incubación.

El medio no utilizado se desechará tres semanas después de haber sido preparado.

6 Aparatos y cristalería

El equipamiento microbiológico habitual (véase la Norma NC-ISO 7218) y en particular lo siguiente.

6.1 Aparato para esterilización en seco (horno) o esterilización húmeda (autoclave)

Véase la Norma NC-ISO 7218.

6.2 Estufa de incubación a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$

6.3 Jarras de atmósfera modificada, o cualquier otro equipo adecuado para cultivo en condiciones anaerobias.

6.4 pH-metro con una resolución de 0.01 unidades de pH, a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, permitiendo que las medidas realizadas tengan una precisión de 0,1 unidades de pH.

6.5 Asas, de platino-iridio o de níquel-cromo, de un diámetro aproximado de 3 mm, y agujas de siembra por punción del mismo material, o asas y agujas de siembra desechables estériles equivalentes.

6.6 Equipo de filtración, para la esterilización de las soluciones

6.7 Tubos de ensayo, frascos o erlenmeyer, de capacidad adecuada, en particular tubos de ensayo de 16 mm x 160 mm, con tubos Durham invertidos, por ejemplo, de una longitud de 35 mm y 7 mm de diámetro.

6.8 Pipetas graduadas de descarga total o micropipetas, de capacidades nominales de 1 ml y de 10 ml, graduadas en divisiones de 0,1 ml y 0,5 ml respectivamente.

6.9 Placas de Petri, hechas de vidrio o de material plástico, de un diámetro entre 90 mm y 100 mm.

6.10 Baños de agua, o equipos similares, que puedan mantenerse entre 44 °C y 47 °C y, a 46 °C $\pm 0,5$ °C.

6.11 Peras de goma, para utilizarse con las pipetas graduadas en la distribución de los componentes del reactivo de la detección de nitritos (si es necesario).

7 Toma de muestra

La toma de muestra no constituye una parte del método especificado en esta Norma Cubana. Si no existe una norma para la toma de muestras del producto de que se trata, se recomienda que las partes interesadas adopten un acuerdo sobre este punto.

Es importante que el laboratorio reciba una muestra que sea verdaderamente representativa y que no haya sufrido daños o cambios durante el transporte o el almacenamiento.

8 Preparación de la muestra

La muestra para análisis se preparará de acuerdo con las Normas ISO 6887-2, ISO 6887-3, ISO 6887-4 o ISO 8261.

9 Procedimiento

9.1 Fracción para análisis, suspensión inicial y diluciones

Véase el apartado adecuado de la Norma ISO 6887 o ISO 8261.

9.2 Siembra e incubación (técnica de siembra por placa vertida)

Se inocula, utilizando una pipeta estéril (6.8), 1 ml de la suspensión inicial, o de la muestra para análisis si el producto es líquido, sobre la parte central de una placa Petri (6.9) vacía, por duplicado.

Se vierten dentro de la placa de 10 ml a 15 ml de agar SC (5.2.3), mantenido entre 44 °C y 47 °C en el baño de agua (6.10), y se mezclan bien con el inóculo haciendo rotar suavemente cada

placa. Cuando el medio se haya solidificado, se añade una capa de recubrimiento de 10 ml del mismo agar SC.

Se deja solidificar. Se introducen las placas en las jarras de atmósfera modificada o en otros recipientes adecuados (6.3) y se incuban en condiciones anaerobias a 37 °C durante 20h ± 2 h. una incubación más larga podría resultar en un ennegrecimiento excesivo de las placas.

Se repite el mismo procedimiento con las diluciones decimales preparadas (véase el apartado 9.1).

9.3 Recuento y selección de colonias

Tras el tiempo de incubación indicado (véase el apartado 9.2), se seleccionan las placas que contengan menos de 150 colonias. De estas, se seleccionan, si fuera posible, las placas que representen diluciones sucesivas.

Se cuentan en cada placa las colonias características de *C. perfringes* presuntivos.

Se seleccionan cinco colonias características y se confirman mediante una de las técnicas descritas en 9.4.2 y 9.4.3.

9.4 Confirmación bioquímica

9.4.1 Generalidades

Se escoge una de las dos técnicas de confirmación descritas en los apartados 9.4.2 y 9.4.3.

Pueden utilizarse galerías bioquímicas comerciales de acuerdo con la Norma NC-ISO 7218.

9.4.2 Técnica de confirmación utilizando el medio LS

NOTA La reacción producida en el medio lactosa sulfito (5.4) cuando se incuba a 46 °C es muy específica de *Clostridium perfringens* y de *Clostridium alsonum*. Por consiguiente, no es necesario asegurarse de que las colonias negras picadas a partir de agar son puras antes de ser inoculadas en el caldo tioglicolato y posteriormente en el medio lactosa sulfito.

9.4.2.1 Inoculación e incubación

Se inocula cada colonia seleccionada (véase el apartado (9.3) en el medio líquido tioglicolato (5.3). Se incuba en condiciones anaerobias a 37 °C durante 18 h a 24 h.

Tras la incubación, y sin dejar ninguna pausa, se depositan cinco gotas del cultivo en tioglicolato sobre el medio LS, utilizando una pipeta estéril. Se incuba en aerobiosis a 46 °C durante 18 h a 24 h en el baño de agua (6.10).

9.4.2.2 Interpretación

Los tubos de medio LS se examinan en cuanto a la producción de gas y la presencia de un color negro (precipitado de sulfuro de hierro). Los tubos Durham que queden llenos de gas en más de una cuarta parte de su volumen y los tubos que presenten el precipitado negro se consideran positivos.

En caso de dudas, cuando el tubo Durham, en un medio ennegrecido, presente un contenido de gas inferior a una cuarta parte de su volumen, se depositará sin pausas, y utilizando una pipeta estéril, cinco gotas del primer cultivo en medio LS (9.4.2.1) sobre un segundo tubo de LS. Se incuba en el baño de agua (6.10) a 46 °C durante 18 h a 24 h. Se examina este tubo como se describió anteriormente.

Las bacterias que formen colonias características en el medio SC y que den un resultado positivo en la confirmación con el medio LS se considerarán como *C. perfringes*. En todos los demás casos, los tubos se considerarán negativos.

9.4.3 Técnica de confirmación utilizando el medio de nitrato-movilidad y el medio de lactosa-gelatina

9.4.3.1 Generalidades

Esta técnica de confirmación requiere colonias características bien aisladas. Cuando este requisito no se cumpla (es decir, cuando la superficie de las placas esté sobrecrecida y no sea posible seleccionar colonias características bien aisladas), se sembrarán cinco colonias características en medio líquido de tioglicolato (5.3) previamente desgasificado.

Se incuba en condiciones anaerobias a 37 °C durante 18 h a 24 h. se reaíslan las colonias mediante estrías sobre placas de medio base de agar SC (véase el apartado 5.2.1.2), y se añade una capa de recubrimiento de 10 ml medio base de agar SC.

Se deja solidificar y se incuba en condiciones anaerobias a 37 °C durante 18 h a 24 h. Se selecciona de cada placa como mínimo una colonia característica bien aislada. Si es necesario, se repetirá el proceso de reaislamiento y siembra en placas de medio base de agar SC hasta que se obtengan colonias características negras bien aisladas.

Esta colonia se confirmará según se describe en los apartados 9.4.3.2, 9.4.3.3 y 9.4.3.4.

9.4.3.2 Siembra y lectura del medio de nitrato-movilidad

Se siembran todas las colonias seleccionadas (véase el apartado 9.3), por punción en medio de nitrato-movilidad (5.5) recién desgasificado.

Se incuba en condiciones anaerobias a 37 °C durante 24 h. Se examina el tipo de crecimiento a lo largo de la línea de siembra del cultivo en el tubo con medio nitrato-movilidad. La movilidad se evidencia como un crecimiento difuso hacia el medio de cultivo alejado de la línea de siembra.

La presencia de nitrito se detecta añadiendo, con la pipeta graduada (6.8) y el gotero de goma (6.11), entre 0,2 ml y 0,5 ml del reactivo de detección de nitrito (5.6) a cada tubo con medio de nitrato-movilidad.

AVISO- Como medida de seguridad, esta prueba deberá realizarse en campana de extracción de gases.

La aparición de un color rojo confirma la reducción de nitrato a nitrito. Si no aparece ningún color rojo tras 15 min, se añadirá una pequeña cantidad de polvo de zinc (5.7), dejando reposar durante

10 min. Si aparece el color rojo tras la adición del polvo de zinc, esto significa que no se ha producido ninguna reducción de nitrato.

9.4.3.3 Inoculación y lectura del medio de lactosa-gelatina

Se inocula por separado todas las colonias seleccionadas (véase el apartado 9.3) en medio lactosa-gelatina (5.8) recién desgasificado. Se incuba en condiciones anaerobias a 37 °C durante 24 h.

Se examinan los tubos del medio de lactosa-gelatina para la presencia de gas y de color amarillo (debido a la formación de ácido), que indica la fermentación de la lactosa. Se enfrían los tubos durante 1 h a 5 °C y se comprueba la licuefacción de la gelatina. Si el medio se solidifica, se reincubará durante un período adicional de 24 h y se volverá a comprobar la licuefacción de la gelatina.

9.4.3.4 Interpretación

Las bacterias que producen colonias negras en medio SC, que no son móviles, que reducen el nitrato a nitrito, que generan gas y ácido a partir de lactosa, y que producen la licuefacción de la gelatina en 48 h, se considera que son *C. perfringens*. Los cultivos que muestren una reacción de nitrito apenas detectable (es decir que den un color rosa) deberán descartarse, ya que *C. perfringens* produce una reacción intensa e inmediata de forma consistente.

10 Expresión de los resultados

10.1 Método de cálculo

Véase la Norma NC-ISO 7218.

10.2 Precisión

10.2.1 Estudio interlaboratorio

Los datos de precisión del método descrito en esta norma están basados en los resultados de un estudio interlaboratorio (véase la referencia [2]). Los detalles de este estudio interlaboratorio se resumen en el anexo A. Los valores límites de la repetibilidad y la reproducibilidad se determinaron empleando tres tipos de alimentos contaminados a diversos niveles y materiales de referencia.

Los valores provenientes de este estudio interlaboratorio pueden no ser de aplicación a intervalos de concentración y matrices distintos a los aquí expuestos.

10.2.2 Repetibilidad

La diferencia absoluta entre dos resultados analíticos (número de *C. perfringens* por gramo o por mililitro) individuales (transformados en logaritmo decimal), o la relación entre el resultado más alto y el más bajo de los dos resultados analíticos en escala normal, obtenidos empleando el mismo método con la misma muestra por el mismo operador empleando los mismos equipos en el intervalo de tiempo más corto posible, no será superior al valor de repetibilidad (r) en más del 5% de los casos.

Los valores siguientes de repetibilidad (r) pueden utilizarse a título indicativo cuando se analicen muestras de alimentos en general. Estos valores de r son medias generales de todas las matrices contempladas en el estudio interlaboratorio:

– r = 0,21 para una confirmación a partir del LS o 0,25 para una confirmación a partir del MN/LG (expresada como la diferencia de los resultados analíticos transformados en logaritmos decimales); o

– r = 1,67 para una confirmación a partir del LS o 1,8 para una confirmación a partir del MN/LG (expresada como una **relación** entre el resultado más alto y el más bajo de los resultados analíticos).

Respecto a los materiales de referencia (véase la tabla A.4), pueden utilizarse los siguientes valores:

– r = 0,13 para una confirmación a partir del LS o 0,12 para una confirmación a partir del MN/LG (expresada como la diferencia de los resultados analíticos transformados en logaritmos decimales); o

– r = 1,3 para una confirmación a partir del LS y a partir del MN/LG (expresada como una relación entre el resultado más alto y el más bajo de los dos resultados analíticos).

EJEMPLO Un primer resultado observado es de 10 000 ó $1,0 \times 10^4$ *C. perfringens* presuntivos por gramo de alimento. Siguiendo las condiciones de repetibilidad, la **relación** entre el resultado más alto y el más bajo, no debería ser superior a 1,9. De esa forma el segundo resultado debería estar entre 5 263 (= $10\,000/1,9$) y 19 000 ($10\,000 \times 1,9$) *C. perfringens* presuntivos por gramo.

10.2.3 Reproducibilidad

La diferencia absoluta entre dos resultados analíticos (número de *C. perfringens* por gramo o por mililitro) individuales (transformados en logaritmo decimal), o la relación entre el resultado más alto y el más bajo de los dos resultados analíticos en escala normal, obtenidos empleando el mismo método con la misma muestra en diferentes laboratorios con diferentes operadores empleando diferentes equipos, no sea superior al valor de reproducibilidad (R) en más del 5% de los casos.

Los valores siguientes de reproducibilidad (R) dados a título indicativo en la tabla 1, pueden emplearse para los diferentes tipos de alimentos y materiales de referencia analizados. Estos valores son medias de los valores obtenidos en el estudio interlaboratorio para los diversos niveles[1]

Tabla 1—Ejemplos de valores de R

Tipo de muestra	Confirmación por LS		Confirmación por MN y LG	
	R (log) ^a	R ^b	R (log) ^a	R ^b
Queso	0,26	1,8	0,31	2,1
Carne	0,55	3,5	0,52	3,3
Piensos deshidratados	0,65	4,5	0,72	5,3
Material de referencia	0,27	1,9	0,29	1,9

^a R (log) es el valor de reproducibilidad expresado como la diferencia entre los resultados transformados en logaritmos decimales.
^b R es el valor de reproducibilidad expresado como una proporción entre los resultados analíticos

EJEMPLO 1 El primer laboratorio encontró un resultado analítico de 10 000 ó $1,0 \times 10^4$ *C. perfringens* por gramo de queso. Siguiendo las condiciones de reproducibilidad, la **relación** del resultado más alto y el más bajo, no debería ser superior a 2,1. De esta forma el resultado del segundo laboratorio debería estar entre 4 761 (= $10\,000/2,1$) y 21 000 ($10\,000 \times 2,1$) *C. perfringens* presuntivos por gramo.

EJEMPLO 2 Un laboratorio desea conocer el nivel máximo que pueda encontrar y que esté conforme con límite predefinido (por ejemplo un límite de 100 000 o $\log_{10}5$). Para ello, el valor R (0,31 en la escala logarítmica para el queso) ha de multiplicarse por un factor de 0,59. Este valor es 0,18 ($0,31 \times 0,59$) como la diferencia entre los valores transformados a logaritmos decimales, o de 1,52 ($10^{0,18}$) como la relación entre los resultados. De esta forma un resultado superior a $\log_{10}5,18$ ($\log_{10}5 + \log_{10}0,18$) o 152 000 ($100\,000 \times 1,52$) no indica incumplimiento con el límite establecido. El factor 0,59 significa que un análisis con un intervalo del 95 % unilateral se utiliza para comprobar si se ha sobrepasado el límite. El factor 0,59 se obtiene de la siguiente fórmula:

$$0,59 = \frac{1,69}{1,96 \times \sqrt{2}}$$

11 Reporte del análisis

El informe del análisis deberá especificar:

- Toda la información necesaria para la identificación completa de la muestra;
- El método de toma de muestras empleado, si se conoce;
- El método de análisis empleado, con referencia a esta norma;
- Todos los detalles operativos no especificados en esta norma, o considerados opcionales, junto con los detalles de todo tipo de incidencias que pudieran haber afectado a el/los resultado(s) del análisis;
- El/los resultados del análisis obtenido(s), o, si se ha comprobado la repetibilidad, el resultado obtenido final citado.

Anexo A
(Informativo)

Resultados del estudio interlaboratorio

Un estudio colaborativo internacional (véase la referencia [2]) en el que participaron 17 laboratorios de 15 países se llevó a cabo con muestras de queso, carne, piensos deshidratados y un material de referencia. Cada una de las muestras de alimentos y piensos se analizaban a tres niveles diferentes de contaminación con *Clostridium perfringens*.

Los parámetros siguientes, de acuerdo con la Norma ISO 16140, fueron seleccionados de los estudios interlaboratorio. El estudio fue organizado por el Instituto Nacional de Salud Pública de los países bajos (RIVM) en enero del año 2000 y proporcionó los datos de precisión mostrados en las tablas A.1 a A.4.

Tabla A.1—Resultados de los análisis de datos obtenidos con las muestras de queso

Muestra	Queso (nivel bajo)	Queso (nivel medio)	Queso (nivel alto)
Número de laboratorios con resultados válidos	13	13	13
Número de muestras	2	2	2
Número de laboratorios retenidos después de eliminar los valores discrepantes	13	13	13
Número de valores discrepantes	0	0	0
Número de muestras aceptadas	26	26	26
Valor medio \bar{x} (\log_{10} cfu/g)	2,5/2,5 ^a	3,5/3,5 ^a	4,5/4,5 ^a
Desviación estándar de repetibilidad, s_r (\log_{10} cfu/g)	0,11/0,11 ^a	0,06/0,07 ^a	0,08/0,10 ^a
Desviación estándar relativa de repetibilidad (%)	4,37/4,59 ^a	1,63/1,97 ^a	1,85/2,31 ^a
Límite de repetibilidad, r	0,30/0,32 ^a	0,16/0,19 ^a	0,23/0,29 ^a
– Como diferencia en una escala logarítmica decimal (\log_{10} cfu/g)	2,0/2,1 ^a	1,5/1,6 ^a	1,7/1,9 ^a
– Como una proporción en escala normal (cfu/g)			
Desviación estándar de reproducibilidad, s_R (\log_{10} cfu/g)	0,13/0,13 ^a	0,08/0,15 ^a	0,11/0,14 ^a
Desviación estándar relativa de reproducibilidad (%)	5,21/5,11 ^a	2,32/4,38 ^a	2,50/3,11 ^a
Límite de reproducibilidad, R	0,36/0,35 ^a	0,23/0,43 ^a	0,31/0,39 ^a
– Como diferencia en una escala logarítmica decimal (\log_{10} cfu/g)	2,3/2,2 ^a	1,7/2,7 ^a	2,1/2,4 ^a
– Como una proporción en escala normal (cfu/g)			
^a El primer resultado se obtuvo empleando el medio lactosa-sulfito y el segundo resultado empleando el medio nitrato-movilidad y el lactosa gelatina			

Tabla A.2—Resultados de los análisis de datos obtenidos con las muestras de carne picada

Muestra	Carne picada (nivel bajo)	Carne picada (nivel medio)	Carne picada (nivel alto)
Número de laboratorios con resultados válidos	13	13	13
Número de muestras	2	2	2
Número de laboratorios retenidos después de eliminar los valores discrepantes	13	13	13
Número de valores discrepantes	0	0	0
Número de muestras aceptadas	26	26	26
Valor medio \bar{x} (\log_{10} cfu/g)	2,7/2,7 ^a	3,6/3,6 ^a	4,5/4,5 ^a
Desviación estándar de repetibilidad, s_r (\log_{10} cfu/g)	0,06/0,11 ^a	0,06/0,10 ^a	0,11/0,09 ^a
Desviación estándar relativa de repetibilidad (%)	2,32/4,22 ^a	1,67/2,70 ^a	2,33/2,01 ^a
Límite de repetibilidad, r	0,18/0,32 ^a	0,17/0,27 ^a	0,29/0,25 ^a
– Como diferencia en una escala logarítmica decimal (\log_{10} cfu/g)	1,5/2,1 ^a	1,5/1,9 ^a	2,0/1,8 ^a
– Como una proporción en escala normal (cfu/g)			
Desviación estándar de reproducibilidad, s_R (\log_{10} cfu/g)	0,14/0,18 ^a	0,18/0,18 ^a	0,18/0,22 ^a
Desviación estándar relativa de reproducibilidad (%)	5,01/6,54 ^a	5,07/5,05 ^a	3,90/4,76 ^a
Límite de reproducibilidad, R	0,38/0,49 ^a	0,51/0,50 ^a	0,49/0,60 ^a
– Como diferencia en una escala logarítmica decimal (\log_{10} cfu/g)	2,4/3,1 ^a	3,2/3,2 ^a	3,1/4,0 ^a
– Como una proporción en escala normal (cfu/g)			

^a El primer resultado se obtuvo empleando el medio lactosa-sulfito y el segundo resultado empleando el medio nitrato-movilidad y el lactosa gelatina

Tabla A.3—Resultados de los análisis de datos obtenidos con piensos deshidratados

Muestra	Pienso (nivel bajo)	Pienso (nivel medio)	Pienso (nivel alto)
Número de laboratorios con resultados válidos	13	13	13
Número de muestras	2	2	2
Número de laboratorios retenidos después de eliminar los valores discrepantes	13	13	13
Número de valores discrepantes	0	0	0
Número de muestras aceptadas	25	26	26
Valor medio \bar{x} (\log_{10} cfu/g)	2,6/2,6 ^a	3,8/3,9 ^a	4,8/4,9 ^a
Desviación estándar de repetibilidad, s_r (\log_{10} cfu/g)	0,07/0,10 ^a	0,08/0,08 ^a	0,06/0,04 ^a
Desviación estándar relativa de repetibilidad (%)	2,85/3,79 ^a	2,09/1,93 ^a	1,22/0,75 ^a
Límite de repetibilidad, r	0,21/0,28 ^a	0,22/0,21 ^a	0,16/0,10 ^a
– Como diferencia en una escala logarítmica decimal (\log_{10} cfu/g)			
– Como una proporción en escala normal (cfu/g)	1,6/1,9 ^a	1,7/1,6 ^a	1,5/1,3 ^a
Desviación estándar de reproducibilidad, s_R (\log_{10} cfu/g)	0,32/0,32 ^a	0,25/0,24 ^a	0,17/0,17 ^a
Desviación estándar relativa de reproducibilidad (%)	12,21/12,03 ^a	6,53/6,18 ^a	3,50/3,49 ^a
Límite de reproducibilidad, R			
– Como diferencia en una escala logarítmica decimal (\log_{10} cfu/g)	0,88/0,88 ^a	0,51/0,50 ^a	0,47/0,47 ^a
– Como una proporción en escala normal (cfu/g)	7,6/7,6 ^a	4,9/4,7 ^a	3,0/3,0 ^a

^a El primer resultado se obtuvo empleando el medio lactosa-sulfito y el segundo resultado empleando el medio nitrato-movilidad y el lactosa gelatina

Tabla A.4—Resultados de los análisis de datos obtenidos con materiales de referencia

Muestra	Material de referencia
Número de laboratorios con resultados válidos	13
Número de muestras	2
Número de laboratorios retenidos después de eliminar los valores discrepantes	13
Número de valores discrepantes	0
Número de muestras aceptadas	26
Valor medio \bar{x} (\log_{10} cfu/cápsula)	3,7/3,7 ^a
Desviación estándar de repetibilidad, s_r (\log_{10} cfu/cápsula)	0,05/0,05 ^a
Desviación estándar relativa de repetibilidad (%)	1,24/1,21 ^a
Límite de repetibilidad, r	0,13/0,12 ^a
– Como diferencia en una escala logarítmica decimal (\log_{10} cfu/cápsula)	1,3/1,3 ^a
– Como una proporción en escala normal (cfu/cápsula)	
Desviación estándar de reproducibilidad, s_R (\log_{10} cfu/cápsula)	0,09/0,09 ^a
Desviación estándar relativa de reproducibilidad (%)	2,51/2,39 ^a
Límite de reproducibilidad, R	0,26/0,25 ^a
– Como diferencia en una escala logarítmica decimal (\log_{10} cfu/cápsula)	1,8/1,8 ^a
– Como una proporción en escala normal (cfu/cápsula)	
^a El primer resultado se obtuvo empleando el medio lactosa-sulfito y el segundo resultado empleando el medio nitrato-movilidad y el lactosa gelatina	

Bibliografía

[1] HAUSCHILD and HILSHEIMER, *Appl. Microbiol.*,27, 1974, pp. 78-82.

[2] SCHULTEN S.M., BENSCHOP E., NAGELKERKE N.J.D. and MOOIJMAN K.A. *Validation of microbiological methods: Enumeration of Clostridium perfringens according to ISO 7937 (second edition, 1997)*. Report 286555002, National Institute of Public Health and the environment, Bilthoven, The Netherlands, 2001.

[3] ISO 16140 – *Microbiología de los alimentos para consume humano y animal. Protocolo de validación de métodos alternativos.*