

Republic of Ecuador

👉 EDICT OF GOVERNMENT 👈

In order to promote public education and public safety, equal justice for all, a better informed citizenry, the rule of law, world trade and world peace, this legal document is hereby made available on a noncommercial basis, as it is the right of all humans to know and speak the laws that govern them.



NTE INEN 1529-8 (1990) (Spanish): Control microbiológico de los alimentos.
Determinación de coliformes fecales y E.coli.

BLANK PAGE



Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria	CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE COLIFORMES FECALES Y <u>E. coli</u>	INEN 1 529-8 1990-02
<p style="text-align: center;">1. OBJETO</p> <p>1.1 Esta norma establece la técnica del número más probable para la determinación de coliformes fecales y las pruebas confirmatorias de <u>Escherichia coli</u> e identificación de las especies del grupo coliforme fecal.</p> <p style="text-align: center;">2. TERMINOLOGIA</p> <p>2.1 Coliformes fecales. Es un grupo de coliformes que en presencia de sales biliares u otros agentes selectivos equivalentes fermenta la lactosa con producción de ácido y gas a temperatura entre 44 y 45,5°C. Este grupo contiene una alta proporción de <u>E. coli</u>, tipo I y II y que en general puede considerarse como equivalente a <u>E. coli</u>, siendo por ello útiles como indicadores de contaminación fecal en los alimentos.</p> <p>2.2 <u>E. coli</u>. Es una especie bacteriana que a más de presentar las características del grupo coliforme fecal, produce indol a partir del triptofano; es positivo a la prueba del rojo de metilo y negativo a la de Voges Proskauer; no utiliza el citrato como única fuente de carbono. Las cepas indol positivas se llaman <u>E. coli</u> Tipo I y se supone que su hábitat natural primario es el intestino.</p> <p>2.3 Recuento de coliformes fecales. Es la determinación del número de coliformes fecales por gramo ó cm³ de muestra de alimento.</p> <p>2.4 Diferenciación de las especies del grupo coliforme fecal. Es el proceso realizado para confirmar la presencia de <u>E. coli</u> y diferenciar las especies y variedades del grupo coliforme fecal mediante el conjunto de pruebas bioquímicas conocidas como "IMVEC".</p> <p>2.5 IMVEC. Es una designación mnemónica de un grupo de cinco pruebas bioquímicas que consiste en:</p> <ul style="list-style-type: none"> I = Verificación de la producción de indol a partir del triptófano M = Reacción del RM (rojo de metilo) para comprobar el descenso del pH del caldo glucosa tamponado V = Reacción de VP (Voges-Proskauer); para comprobar la producción de acetoina a partir de glucosa. E = Prueba de Eijkman, para comprobar la termotolerancia o crecimiento a 44 - 45,5 ± 0,2°C. C = Utilización del citrato como fuente de carbono. <p style="text-align: center;">3. RESUMEN</p> <p>3.1 Este método se basa en la prueba de Eijkman modificada para detectar la fermentación de la lactosa con producción de gas a 44 - 45,5 ± 0,2°C y complementada con la prueba de indol a esta temperatura, estos ensayos se realizan en caldo brillante-bilis lactosa y en caldo triptona partiendo de un inóculo tomado de cada tubo gas positivo del cultivo para coliformes totales, (ver INEN 1 529-6) e incubados a 45,5 ± 0,2°C. La confirmación de <u>E. coli</u> y la diferenciación de las especies y variedades del grupo coliforme fecal, se realizan mediante los ensayos para indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer y citrato sódico.</p>		

(Continúa)

4. EQUIPO Y MATERIALES DE VIDRIO

4.1 Equipo usual en un laboratorio microbiológico en particular.

4.1.1 Citados en numeral 4 de la Norma INEN 1 529-6.

4.1.2 Placas porta objetos.

4.1.3 Baño de agua regulable a $44 - 45,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

5.1 Caldo verde brillante bilis-lactosa (BGBL) o similar, ver preparación caldos de cultivo en la Norma INEN 1 529-1.

5.2 Caldo triptona; ver preparación caldos de cultivo en la Norma INEN 1 529-1.

5.3 Agar eosina azul metileno (EMB); ver preparación agares en la Norma INEN 1 529-1.

5.4 Agar de contage en placa (PCA); ver preparación agares en la Norma INEN 1 529-1.

5.5 Caldo MR-VP; ver preparación caldos de cultivo en la Norma INEN 1 529-1.

5.6 Reactivos de Kovacs; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1 529-1.

5.7 Solución de Rojo de metilo; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1 529-1.

5.8 Solución de Creatina al 0,5%; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1 529-1.

5.9 Solución alcohólica de α -naftol al 6%; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1 529-1.

5.10 Solución de hidróxido de Potasio al 40%; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1 529-1.

5.11 Agar citrato de Simons; ver preparación agares en la Norma INEN 1 529-1.

5.12 Solución alcohol-acetona; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1 529-1.

5.13 Solución fenicada de cristal violeta al 1%; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1529-1.

5.14 Solución fenicada de fucsina básica al 1%; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1529-1.

5.15 Solución de lugol; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1529-1.

(Continua)

6. PROCEDIMIENTO

6.1 Coliformes fecales

6.1.1 Simultáneamente con el ensayo confirmatorio de la Norma INEN 1 529-6 inocular dos o tres asas de cada uno de los tubos presuntamente positivos en un tubo conteniendo 10 cm³ de caldo BGBL (5.1) y en otro que contenga aproximadamente 3 cm³ de caldo triptona (5.2) (ver esquema 1).

6.1.2 Incubar estos tubos a 45,5 ± 0,2°C (baño María) por 48 horas.

6.1.3 al cabo de este tiempo anotar la presencia de gas en los tubos de BGBL y añadir dos o tres gotas del reactivo de Kovacs a los tubos de agua triptona. La reacción es positiva para el indol si en cinco minutos se forma un anillo rojo en la superficie de la capa de alcohol amílico; en la prueba negativa el reactivo de Kovacs conserva el color original.

6.1.4 Los cultivos gas positivos en caldo verde brillante bilis-lactosa incubados a 30 ó 35°C y a 45,5°C y que producen indol a 45,5°C son considerados coliformes fecales positivos.

6.2 Confirmación de E. coli y diferenciación de las especies del grupo mediante las pruebas IMViC. En situaciones que justifiquen el esfuerzo y sean necesarias la conformación de E. coli y la diferenciación de las especies del grupo coliforme fecal, realizar los ensayos para indol, rojo de metilo, Voges Praskauer y citrato sódico (Pruebas IMViC), de la siguiente forma:

6.2.1 De cada tubo de caldo BGBL que sea positivo para coliformes fecales (6.1), sembrar por estría un asa en una placa individual de agar eosina azul de metilo o agar VRB previamente seca e identificada.

6.2.2 Incubar las placas invertidas a 35 - 37°C por 24 horas.

6.2.3 Para confirmar la presencia de E. coli, de cada placa escoger 2 - 3 colonias bien aisladas y típicas (negra o nucleada con brillo verde metálico de 2 - 3 mm de diámetro) y sembrar en estría en tubos de agar PCA o agar nutritivo inclinado e incubar los cultivos a 35 - 37°C por 24 horas.

6.2.4 Hacer extensiones a partir de los cultivos en agar PCA o nutritivo inclinado y teñirlos por el método de Gram, si se comprueba la pureza de los cultivos de sólo bacilos Gram. negativos no esporulados, utilizar éstos para la prueba IMViC.

6.2.5 Prueba para indol Sembrar en un tubo de agua triptona un asa de cultivo puro (6.2.4), incubar 24 horas a 35 - 37°C. Añadir al tubo 0,5 cm³ del reactivo de Kovacs. La aparición de un color rojo oscuro en la superficie del reactivo, indica una prueba positiva. En la prueba negativa el reactivo conserva el color original.

6.2.6 Prueba del rojo de metilo (RM). Sembrar en un tubo de caldo MR-VP un asa de cultivo puro (6.2.4) incubar 24 horas a 35 - 37°C, añadir a cada tubo aproximadamente 3 gotas de la solución de rojo de metilo, agitar; si el cultivo se torna rojo la prueba es positiva y negativa si hay viraje a amarillo.

(Continua)

6.2.7 Prueba de Voges-Proskauer (VP). Sembrar en un tubo de caldo MR-VP un asa de cultivo puro (6.2.4) e incubar 24 horas a 35 - 37°C.

6.2.7.1 Luego de este período, añadir los siguientes reactivos cuidando de agitar el tubo después de cada adición:

- solución de creatina al 0,5%. 2 gotas
- solución alcohólica de α -naftol al 6% 3 gotas
- solución de hidróxido de potasio al 40% : 2 gotas.

6.2.7.2 Observar dentro de 15 minutos. La aparición de un color rosado o rojo brillante, generalmente al cabo de cinco minutos el resultado es positivo.

6.2.8 Prueba para la utilización del citrato. Un asa del cultivo puro (6.2.4) sembrar por estría en la superficie de la lengüeta de agar citrato inclinado e incubar 24 horas a 35 - 37°C. La reacción es positiva si hay crecimiento visible que se manifiesta por lo general en el cambio de color del medio, de verde a azul.

6.2.9 Considerar como E. coli a los microorganismos que presentan las siguientes características: bacilos Gram. negativos no esporulados que producen gas de la lactosa y reacción IMVEC ver Tabla 1.

7. CALCULOS

7.1 Coliformes fecales

7.1.1 Calcular la densidad de coliformes fecales sólo en base del número de tubos que a 45,5°C presentan gas en el caldo BEGL e indol en el caldo triptona, seguir las instrucciones de los numerales 8, 9 y 10 de la Norma INEN 1 529-6

7.2 E. coli. Para determinar el NMP de E. coli proceder según las instrucciones de los numerales 8, 9 y 10 de la Norma INEN 1 529-6 basándose únicamente en todos los tubos que presentan bacilos con las características indicadas en el numeral 6.2.9.

8. INFORME DE RESULTADOS

8.1 Coliformes fecales. Reportar NMP de coliformes fecales/g ó cm³ de muestra.

8.2 E. coli.

8.2.1 Reportar NMP de E. coli/g ó cm³ de muestra

(Continua)

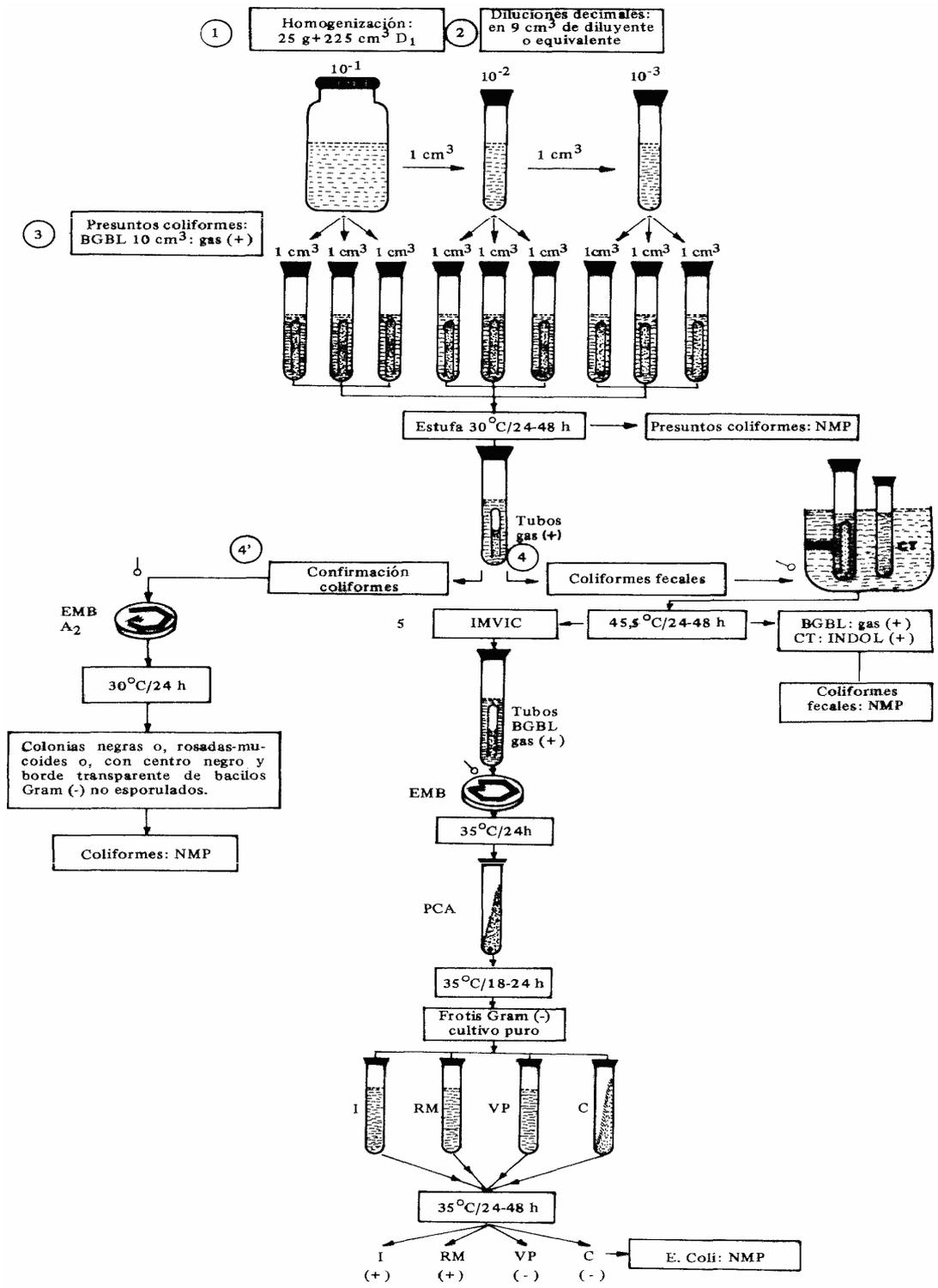
TABLA 1

CLASIFICACION DE LOS COLIFORMES POR LAS PRUEBAS "IMViC"					
	Gas en caldo B.G.B.L. 44 - 45,5 °C	Prueba del indol 44 - 45,5 °C	MR	VP	Crecimiento en Citrato
E. coli					
- Típico (tipo I)	+	+	+	-	-
-Atípico (tipo II)	-	-	+	-	-
Intermedios					
Típicos (tipo II)	-	+	+	-	+
Atípicos (tipo I)	-	-	+	-	+
Enterobacter-ae rógenes:					
Típico (tipo I)	-	-	-	+	+
Atípico (tipo II)	-	+	-	+	+
Esterobacter-cloacae	-	-	-	+	+
Irregulares:					
- Tipo I	-	-	-	-	-
- Tipo II	+	-	-	-	-
- Tipo V I	+	-	+	+	+
Irregulares, otros tipos	V *	V *	V *	V *	V *

(Continua)

ESQUEMA

COLIORMES TOTALES, FECALES, E. COLI



(Continua)

APENDICE Z

Z.1 NORMAS A CONSULTAR

INEN 1 529-1 *Control microbiológico de los alimentos. Preparación de medios de cultivo.*
INEN 1 529-6 *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de microorganismos coliformes por la técnica del número más probable.*

Z.2 BASES DE ESTUDIO

Norma International ISO 4831 *Microbiology General Guidance for the enumeration of Coliforms - Most probable number Technique at 30°C.* Primera edición. Ginebra 1978.

I.C.M.S.F. *Microorganismos de los alimentos 1. Técnicas del análisis microbiológico.* Editorial Acribia, Zaragoza, España.

FAO-FOOD AND NUTRITION PAPEL 14/4 *Manual of food quality control 4. Microbiological analysis.* Roma. 1979.

Food and Drug Administration Bureau of foods Division of Microbiology, *Bacteriological Analytical Manual.* 5ta. edición. 1978.

Centro Nacional de Alimentación y Nutrición. *Método de examen microbiológico para alimentos y bebidas.* Normas recomendadas. Manual Práctico, Madrid, 1976.

International Dairy Federation; FIL-IDF-73 *Milk and Mild Products count of Coliform Bacteria,* Internacional Dairy Federation. Bruselas, 1974.

Mossel D.A. Moreno García B. *Microbiología de los alimentos,* Editorial Acriba., Zaragoza, España, 1982.

Harrigan, W.F. McLance, M.E. *Métodos de laboratorio en microbiología de los alimentos y productos lácteos.* León, España, 1979.

**Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN - Baquerizo Moreno E8-29 y Av. 6 de Diciembre
Casilla 17-01-3999 - Telfs: (593 2)2 501885 al 2 501891 - Fax: (593 2) 2 567815**

Dirección General: E-Mail: furresta@inen.gov.ec

Área Técnica de Normalización: E-Mail: normalizacion@inen.gov.ec

Área Técnica de Certificación: E-Mail: certificacion@inen.gov.ec

Área Técnica de Verificación: E-Mail: verificacion@inen.gov.ec

Área Técnica de Servicios Tecnológicos: E-Mail: inencati@inen.gov.ec

Regional Guayas: E-Mail: inenguayas@inen.gov.ec

Regional Azuay: E-Mail: inencuenca@inen.gov.ec

Regional Chimborazo: E-Mail: inenriobamba@inen.gov.ec

[URL:www.inen.gov.ec](http://www.inen.gov.ec)