

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

	Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:
	Miguel Alemán Polo Control Sanitario de Medio Ambiente Acuicola	María Estela Ayala Galdós Director (e) de Servicio Nacional de Sanidad Pesquera	Juan Neira Granda Dirección Ejecutiva
Firma			
Fecha	21.08.09	26.08.09	28.08.09
	Daissy Teresa Woolcott Crispin LABS ITP	Alberto Salas Maldonado División de Investigación	
Firma			
Fecha	21.08.09	26.08.09	

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

CAPITULO I. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

INDICE

SECCIÓN I. MANIPULACION Y PREPARACION DE LA MUESTRA

SECCIÓN II. PREPARACION DE MUESTRAS, SUSPENSION INICIAL Y DILUCIONES DECIMALES PARA EXAMINACION MICROBIOLÓGICA

SECCIÓN III. SECCIÓN III. NUMERACIÓN DE ESCHERICHIA COLI - ISO

SECCIÓN IV. ENUMERACIÓN DE BACTERIA COLIFORMES Y DE ESCHERICHIA COLI. FDA

SECCIÓN V. TÉCNICA DE TUBOS MÚLTIPLES DE FERMENTACIÓN PARA LOS MIEMBROS DEL GRUPO COLIFORMES Y COLIFORMES FECALES. APHA.

SECCIÓN VI. DETECCIÓN DE SALMONELLA. ISO

SECCIÓN VII. DETECCION DE SALMONELLA EN ALIMENTOS. FDA

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

SECCIÓN I. MANIPULACION Y PREPARACION DE LA MUESTRA

Bacteriological Analytical manual on Line. FDA. April 2003. Food Sampling and preparation of sample homogenate, 2B-G, 1998 Chapter 1. AOAC International.

PRODUCTO : PRODUCTOS PESQUEROS FRESCOS, REFRIGERADOS O CONGELADOS

REFERENCIA: 1. Bacteriological Analytical manual on Line. FDA. April 2003. Food Sampling and preparation of sample homogenate, 2B-G, 1998 Chapter 1. AOAC International.

La idoneidad y condición de la muestra o espécimen recibido para su examen es de primera importancia. Si las muestras son colectadas y manipuladas inadecuadamente o no son representativas del lote muestreado, los resultados del laboratorio no tendrán sentido. Debido a que las interpretaciones sobre un envío grande de alimentos se basan en una muestra relativamente pequeña del lote, los procedimientos de muestreo establecidos se deben aplicar uniformemente¹. Una muestra representativa es esencial cuando los patógenos o las toxinas son escasos en su distribución dentro del alimento o cuando la disposición de un envío de alimento depende del contenido bacteriano demostrado en lo referente a una norma jurídica.

Mantener las muestras congeladas en todo momento sólidamente heladas. Refrigerar las muestras, excepto mariscos y otras especies con caparazón, en hielo de 0-4°C y transportarlos en una caja de muestra con el refrigerante apropiado capaz de mantener la muestra de 0-4°C hasta llegar al laboratorio. No helar los productos refrigerados. Excepto en otro caso específico, no deben analizarse las muestras refrigeradas más de 36 h después de la colección. Las condiciones especiales se aplican a la colección y almacenamiento de desconchado, marisco descongelado y otras especies con caparazón. La muestra embalada de marisco desconchado colocarlas inmediatamente en el hielo triturado (ninguna temperatura específica) hasta analizarla; guarde la existencia de la cáscara sobre frío pero por debajo de 10°C. Examinar la cáscara y el marisco refrigerado dentro de las 6 h de colección pero en ningún caso más de 24 h después de la colección.

1. Equipos y Materiales.

¹ Parte del contenido de este último párrafo se aplica al ámbito de un trabajo de muestreo o inspección, labor que no está contemplada en los servicios de ensayo que pretende brindar el Laboratorio de Microbiología.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

1.1. **Homogenizador Mecánico.** Se dispone de varios tipos de homogenizadores. Utilice un homogenizador que tenga varias velocidades de operación o reóstato de regulación. El término "homogenizador de alta velocidad" se aplica a un equipo mezclador dotado de un sistema de 4 cuchillas inclinadas, afiladas y de acero inoxidable que giran en el fondo de un vaso tetralobulado a 10000 - 12000 RPM o con una acción de corte equivalente. Los sólidos suspendidos son reducidos a una pulpa fina por la acción conjunta de las cuchillas y del vaso lobular, el cual arremolina los sólidos suspendidos sobre las cuchillas. Teniendo cuidado con el homogenizador, o equivalente, que debe cumplir los siguientes requisitos:

- 1.2. Vasos de homogenizador, de vidrio o acero inoxidable, estériles, con capacidad aproximada de 1000 mL, con tapa y autoclave por 60 min. a 121 °C.
- 1.3. Balanza con pesas, capacidad de 2000 g y sensibilidad de 0,1 g.
- 1.4. Vasos estériles de 250 mL, cubiertos con papel aluminio
- 1.5. Pipetas graduadas estériles, de 1,0 y 10,0 mL.
- 1.6. Cuchillos, tenedores, espátulas, pinzas, tijeras, cucharas de sopa y bajalenguas estériles (para manipulación de las muestras).

2. Medios y Reactivos.

- 2.1. Solución Tamponada de Butterfield, esterilizada en frascos con un volumen final de 90 ± 1 mL.

3. Recepción de las Muestras.

3.1. Condición de los recipientes de muestreo. Controlar dichos envases de muestreo en busca de defectos físicos visibles. Inspeccionar cuidadosamente que las bolsas plásticas y frascos de muestreo no presenten rasgaduras, agujeros de alfiler o marcas de perforación. Si las unidades muestrales fueron colectadas en botellas plásticas, revisar que las botellas no presenten fracturas o tapas flojas. Si se usaran las bolsas plásticas para el muestreo, asegurarse que los alambres (usados para sellar las bolsas) de torsión no perforen las bolsas circundantes. Cualquier contaminación cruzada producto de uno o más de los defectos antes mencionados invalidarán la muestra, y la zona en que se colectó la muestra debe ser notificado.

3.2 Rotulado y registro. Asegurarse que cada muestra esté acompañada de una copia completa del Reporte de Colección y sellada oficialmente con un precinto portando el número de muestra, nombre del colector oficial y fecha². Asignar a cada unidad muestral un número o código individual y analizarla como una unidad discreta, a menos que se trate de una muestra compuesta.

² Parte del contenido de este último párrafo se aplica al ámbito de un trabajo de muestreo o inspección, labor que no está contemplada en los servicios de ensayo que pretende brindar el Laboratorio de Microbiología

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

3.3 Almacenamiento. Preferentemente, examinar las muestras inmediatamente después de recibidas. Sin embargo, si el análisis debe posponerse, almacenar las muestras congeladas a -20 °C hasta su examen. Refrigerar las muestras perecibles no congeladas a 0-4 °C, por no más de 36 horas. Almacenar los alimentos no perecibles, conservas o comidas de baja humedad a temperatura ambiente hasta su análisis.

4. Descongelamiento.

- 4.1. Usar técnicas asépticas cuando se manipule el producto. Antes de manipular o analizar una muestra, limpiar las áreas inmediata y circundante de trabajo. Además, fregar el área inmediata de trabajo con agente germicida comercial. Preferiblemente, no descongelar las muestras congeladas antes de su análisis.
- 4.2. De ser necesario, temperar una muestra congelada para obtener la porción analítica, descongelándola en el recipiente original o recipiente en el cual fue recibida en el laboratorio. Siempre que sea posible, evítese transferir la muestra a un segundo recipiente para su descongelamiento.
- 4.3. Normalmente, una muestra puede ser descongelada de 2-5 °C en 18 horas. Si se desea un rápido descongelamiento, descongelar la muestra a no menos de 45 °C por no más de 15 minutos. Cuando se descongele la muestra a temperaturas elevadas, agitar la muestra continuamente en un baño termostático controlado.

5. Mezcla.

5.1. Generalidades

- 5.1.1 Debe esperarse diversos grados de distribución no uniforme para los microorganismos dentro de cualquier alimento. Para asegurar una distribución más homogénea, agitar las muestras líquidas completamente y de ser práctico, mezclar las muestras secas con cucharas u otros utensilios estériles antes de retirar la unidad analítica de una muestra de 100 g o más (actualmente el laboratorio no usa dichos pesos).
- 5.1.2. Use una unidad analítica de 50 g de líquido o alimento seco para determinar el valor del número de microorganismos Aerobios Mesófilos Viables y el número más probable de Coliformes. Otros tamaños de unidad analítica también pueden ser recomendables (por ejemplo, 25 g para Salmonella), dependiendo del análisis específico que vaya a realizarse. Usar el tamaño de unidad analítica y el volumen de diluyente recomendados por el método del Manual Analítico Bacteriológico apropiado que se usa. Si los volúmenes del envío obviamente no son homogéneos (por ejemplo, alimentos congelados), macerar el contenido total del envase y extraer la unidad analítica, o, de preferencia,

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

analizar por separado cada porción diferente del alimento, dependiendo del propósito del ensayo.

5.2. Por Producto

a. Mariscos (Crustáceos y Moluscos):

CRUSTACEOS CON CAPARAZON: Desinfectar la superficie del caparazón con alcohol de 70° para remover asépticamente, con ayuda del material estéril.

CRUSTACEOS SIN CAPARAZON: Manipular la carne asépticamente con material estéril.

MOLUSCOS: Descartar cualquier individuo abierto o dañado. Tomar el suficiente número (15 grandes o 30 pequeños) de individuos, para que el volumen de carne más líquido intervalvar no sea inferior al ensayo a usar, e introducirlos en un cristizador (fuente de cristal o Beacker) de agua con cloro (0,2 ppm de cloro libre): Limpiar los moluscos uno a uno bajo el grifo de agua corriente y con un cepillo quitar algas, tierra y otras sustancias. Después de un cuidadoso lavado de manos, abrir las valvas previo flameado rápido, con un cuchillo o abridor de ostras esterilizado. Seccionar el pie del molusco y recoger el cuerpo y el líquido intervalvar en una placa tórex o probeta graduada estéril (ref. 3).

6. Pesado.

- 6.1. Tarar el vaso de homogenizador.
- 6.2. Pesar asépticamente y con precisión ($\pm 0,1$ g) el alimento descongelado (si fuese congelado) dentro del vaso o recipiente de homogenización.
- 6.3. Si la muestra entera pesa menos que la cantidad requerida para el análisis, pesar una porción equivalente a la mitad de la unidad analítica y ajustar la cantidad de diluyente o caldo de acuerdo a ello.
- 6.4. El volumen total del diluyente en el homogenizador debe cubrir completamente las cuchillas.

7. Homogenización y Dilución de las Muestras que Requieran Enumeración de Microorganismos.

- 7.1. Añadir 450 ml de Solución Tamponada de Butterfield al vaso del homogenizador conteniendo los 50 g. de la unidad analítica y homogenizar 2 minutos. El homogenizado resultante constituye la dilución 10^{-1} .
- 7.2. Preparar las diluciones sucesivas rápidamente a partir del homogenizado original, usando pipetas que liberen el volumen requerido con precisión. No pipetear menos del 10% del volumen total de la pipeta; por ejemplo, no usar una

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

pipeta con capacidad mayor de 10 ml para liberar volúmenes de 1 ml; para pipetear volúmenes de 0,1 ml, no usar pipetas de capacidad mayor a 1,0 ml.

- 7.3. Preparar todas las diluciones decimales con 90 ml del diluyente estéril más 10 ml de la dilución previa, a menos que se especifique lo contrario. Agite todas las diluciones vigorosamente 25 veces en el arco de 30 centímetro (1 pie) en 7 s. No debe transcurrir más de 15 minutos desde el momento en que la muestra es homogenizada hasta que todas las diluciones de la misma estén en los medios apropiados.

8. Reactivos y Medios de Cultivo.

8.1. Solución Tamponada de Butterfield

Solución Patrón (Stock):

KH₂PO₄..... 34 g
Agua destilada 500 ml

Ajustar el pH a 7,2 con NaOH 1 N. Enrasar el volumen a 1 litro con agua destilada. Esterilizar por 15 minutos a 121°C. Guardar en refrigeración.

Diluciones:

Tomar 1,25 ml de la Solución Stock y enrasar hasta un volumen de 1 litro con agua destilada. Dispensar 90 o 99 ± 1 ml en frascos adecuados. Esterilizar por 15 minutos a 121°C.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

SECCIÓN II. PREPARACION DE MUESTRAS, SUSPENSION INICIAL Y DILUCIONES DECIMALES PARA EXAMINACION MICROBIOLÓGICA
MICROBIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS Y ALIMENTACION ANIMAL

PARTE 1

Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y diluciones decimales.

ENSAYO : Detección de Salmonella, NMP *E. Coli*

PRODUCTO : Moluscos Bivalvos, gasterópodos y tunicados

1. DEFINICIONES

Para los propósitos de esta parte de la ISO 6887 las siguientes definiciones son aplicadas:

1.1 Suspensión Inicial (Dilución Primaria)

La suspensión, solución o emulsión obtenida después de una cantidad de producto pesado o medido bajo examinación (o de una muestra preparada a partir del producto) ha sido mezclada con una cantidad de nueve veces de diluyente, permitiendo que las partículas grandes, si están presentes, sean disueltas.

1.2 Diluciones decimales posteriores

Las suspensiones o diluciones obtenidas por la mezcla de un volumen medido de una suspensión inicial (3.1) con nueve veces de volumen de diluyente y por repetición de esta operación con diluciones posteriores hasta una serie de diluciones decimales, se obtiene una adecuada inoculación en el medio de cultivo.

1.3. Estándar específico

Un Estándar Internacional o Documento de Guía describiendo la examinación de un producto específico (o grupo de productos) para la detección o enumeración de un microorganismo específico (o grupo de microorganismos).

2. PRINCIPIO

La preparación de una suspensión inicial (3.1) es una manera de obtener una distribución lo más uniformemente posible de microorganismos contenidos en porción de ensayo.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

La preparación, si es necesario, de diluciones decimales (3.2) para reducir el número de microorganismos por unidad de volumen permite después de la incubación, la observación de su crecimiento o no (en el caso de tubos o botellas) o en el conteo de colonias (en el caso de placas), como se indica en cada estándar específico.

NOTA Con el fin de restringir el rango de enumeración a un determinado intervalo, o si elevado número de microorganismos son previsto, es posible inocular únicamente las diluciones decimales necesarias (al menos dos diluciones sucesivas) para lograr la enumeración según el calculo descrito en la ISO 7218.

3. DILUYENTES

3.1 Materiales Básicos

Con el fin de mejorar la reproducibilidad de los resultados, se recomienda para la preparación del diluyente, los componentes básicos deshidratados o una preparación completa deshidratada para ser usada. Las instrucciones del fabricante deberán ser seguidas rigurosamente.

Los productos químicos deberán ser de calidad analítica reconocida y adecuada para análisis microbiológico.

El agua usada debe ser destilada o su equivalente en calidad (ver ISO 7218)

3.2 Diluyentes para uso general

3.2.1. Solución Peptonada Salina

3.2.1.1 Composición

Enzima digerida de Caseína (triptona).....	1,0 g
Cloruro de Sodio.....	8,5g
Agua	1000 mL

3.2.1.2. Preparación

Disolver los componentes en el agua, por calentamiento si es necesario.

Si es necesario ajustar el pH para que después de la esterilización este sea de $7,0 \pm 0,2$ a 25°C

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

3.2.2. Agua Peptonada Bufferada

3.2.2.1 Composición

Enzima digerida de tejido de animal	10.0 g
Cloruro de Sodio	5,0 g
Disodio fosfato de hidrogeno dodecahidratado (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O)	9.0 g
Dihidrogeno fosfasto potasico (KH ₂ PO ₄)	1.50 g
Agua,	1000 mL

3.2.2.2 Preparación

Disolver los componentes en el agua, por calentamiento si es necesario.
Si es necesario, ajustar el pH de modo que, después de la esterilización, sea 7,0 ± 0,2 a 25 a 25°C.

3.3. Diluyentes para propósitos especiales

Ver el estándar específico apropiado al producto concerniente
NOTA ISO 6887-2 (bajo preparación) dará las reglas específicas.

3.4 Distribución y esterilización del diluyente

Dispensar el diluyente (5.2 o 5.3) en volúmenes según sea necesario para la preparación de las suspensiones iniciales dentro del matraz (6.4) de capacidad apropiada.

Dispensar el diluyente (5.2 o 5.3) en volúmenes según sea necesario para la preparación de las diluciones decimales dentro de los tubos de ensayo (6.5) o matraces (6.4) en cantidades de modo que, después de la esterilización, cada tubo o matraz contenga 9,0 mL. La incertidumbre de la medida de este volumen final, después de la esterilización, no deberá exceder ± 2 %.

NOTA Si es destinado para contar varios grupos de microorganismos usando diferentes medios de cultivo, sería necesario distribuir todos los diluyentes (o algunos de ellos) en cantidades más grandes que 9,0 mL; el tamaño de los matraces (6.4) y los tubos de ensayo (6.5) serán como corresponda específicamente. Tapar los tubos o matraces.

Esterilizar en la autoclave a 121 °C por 15 min.

4. Aparatos y Material de vidrio

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

El equipo usual de un laboratorio de microbiología (ver ISO 7218) y, en particular, lo siguiente.

- 4.1 **Aparatos para esterilización en seco (estufa) y esterilización húmeda (autoclave)**
Ver ISO 7218
- 4.2 **Equipo para picar (blender)** Ver ISO 7218
- 4.3 **Agitador Mecánico** Ver ISO 7218
- 4.4 **Matraces o botellas con tapa rosca**, de capacidades apropiadas.
- 4.5 **Tubos de ensayo**, de capacidades apropiadas.
- 4.6 **Pipetas graduadas de dispensación total** de capacidad nominal 1 mL y 10 mL, graduadas en divisiones de 0,1 mL y 0,5 mL respectivamente.
- 4.7 **pH-metro**, capaz de leer con una precisión de 0,01 unidad de pH a 25 °C, posibilitando las mediciones a realizarse con una exactitud $\pm 0,1$ unidades de pH.
- 4.8 **Balanza**, capaz de pesar con una precisión de 0,01 g.

5. MUESTREO.

Llevar a cabo el muestreo de acuerdo con el método específico apropiado para el producto concerniente. Si ese estándar específico no está disponible, se recomienda un acuerdo por las partes concernientes.

6. PREPARACION DE LA MUESTRA DE ENSAYO

Ver el Estándar específico apropiado para el producto concerniente. Si ese estándar específico no está disponible, se recomienda un acuerdo por las partes concernientes.

7. PROCEDIMIENTO

7.1 Porción del análisis, suspensión inicial (dilución primaria)

Dentro de un contenedor estéril o bolsa plástica estéril, pesar, con una medida de incertidumbre de $\pm 5\%$, una masa m g o medir con una medida de incertidumbre de $\pm 5\%$, un volumen de V mL (mínimo 10 g o 10 mL, a menos que se declare lo contrario) representativo para la muestra de ensayo (ver cláusula 8).

Adicionar una cantidad de diluyente igual a $9 \times m$ g o $9 \times V$ mL. Esta cantidad puede ser medida preferiblemente por masa con una medida de incertidumbre de $\pm 5\%$ o por volumen con una medida de incertidumbre de $\pm 5\%$.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

NOTA 1 Si es necesario, en ciertas ocasiones, particularmente en productos que dan una suspensión inicial de 1 + 9 la cual es muy viscosa o muy densa, adicionar más diluyente. Esto deberá ser tomado en cuenta para las operaciones subsecuentes y/o en la expresión de resultados.

NOTA 2 Esta dilución primaria en parte condiciona el valor del mas bajo limite de enumeración, la cual también depende de la técnica usada (por ejemplo, técnica de placa con un 1 mL de inculo de una suspensión 1/10, para que el limite sea 10 microorganismos por gramo). Si esto es necesario, para algunas enumeraciones en ciertos productos, caerá bajo de este límite, es posible usar un volumen más pequeño de diluyente ¹⁾. Deberá ser notado que la inoculación de esta suspensión inicial resultaría dificultosa debido al desequilibrio en la proporción de inculo/medio (inhibición del crecimiento microbiano por la concentración incrementada de los componentes del alimento).

Evitar el daño de los microorganismos por cambios repentinos en temperatura, la temperatura del diluyente durante las operaciones dadas abajo deberá ser aproximadamente el mismo que la temperatura ambiente, excepto para productos particulares (ver estándar específico).

Homogenizar la mezcla de acuerdo a las recomendaciones de la ISO 7218.

Permitir que las partículas grandes sean disueltas, si es necesario, hasta 15 min. Los sistemas de filtración dan resultados equivalentes pueden ser utilizados.

En el caso de enumeración de esporas, un tratamiento al calor de la suspensión inicial, por ejemplo 10 min a 80 °C, deberá ser realizado inmediatamente después de su preparación, seguido por un rápido enfriamiento.

¹⁾ En este caso, el volumen del diluyente usado deberá ser reportado en el reporte de ensayo.

7.2 Diluciones decimales posteriores

Transferir, por medio de una pipeta, 1 mL de la suspensión inicial con una incertidumbre ²⁾ de ± 5 %, dentro de un tubo conteniendo 9 mL de diluyente estéril a la temperatura apropiada.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

NOTA Si un gran volumen es necesario, es posible adicionar un volumen adecuado (mayor que 1 mL) de la suspensión inicial, con una incertidumbre de medida de $\pm 5\%$, dentro de un tubo conteniendo nueve veces el volumen del diluyente estéril.

Para una óptima precisión, no introducir la pipeta más de 1 cm dentro de la suspensión inicial.

Evitar algún contacto entre la pipeta conteniendo el inóculo y el diluyente estéril.

Mezclar completamente, preferiblemente por usar un agitador mecánico (6.3) por 5 s a 10 s, para obtener una dilución de 10^{-2} .

Si es necesario repetir estas operaciones usando la 10^{-2} y diluciones posteriores utilizando por cada dilución una pipeta nueva estéril, para obtener 10^{-3} , 10^{-4} , etc., diluciones, hasta que el número apropiado de microorganismos haya sido obtenido (ver cláusula 4).

7.3 Duración del procedimiento

El lapso de tiempo entre el final de la preparación de la suspensión inicial y el instante cuando el inóculo entra en contacto con el medio de cultivo no deberá exceder de 45 minutos mientras el límite de 30 minutos es el lapso de tiempo entre la preparación de la suspensión inicial (9.1) y el comienzo de la preparación de la siguiente dilución decimal, a menos que se especifique lo contrario en el Estándar Internacional específico.

NOTA Si el ambiente de temperatura de laboratorio es muy alto, estos dos tiempos de duraciones máximas deberían ser reducidas.

²⁾ La medida de incertidumbre retenidas de $\pm 5\%$ es tomado en cuenta para los límites presentes de pipetas usadas frecuentemente.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

SECCIÓN III. NUMERACIÓN DE ESCHERICHIA COLI

Método horizontal para la enumeración de *E. coli* β -glucoronidasa positivo.

Parte 3: Técnica del Numero Mas Probable usando 5-bromo-4-cloro-3-indol β -glucoronidasa

ISO/TS 1664 9-3: 2005.

ENSAYO : Microbiología de los alimentos y productos de alimentación animal - Método horizontal para la enumeración de *E. coli* β -glucoronidasa positivo.

PRODUCTO : Productos destinados al consumo humano y la alimentación de animales, muestras de un medio ambiente en el ámbito de la producción de alimentos y la manipulación de alimentos.

REFERENCIA:

Las siguientes referencias son indispensables para la aplicación de este documento.

ISO 6887-1. Preparación de las muestras, suspensión inicial y dilución decimal para examinación microbiológica.

ISO 6887-4 Reglas especiales para la preparación de productos, leche y productos lácteos, carne y productos cárnicos, pescado y productos pesqueros.

1. TÉRMINOS Y DEFINICIONES:

1.1 *Escherichia coli*. β -glucoronidasa positivo

Bacteria que a 44°C da una coloración típica de las colonias verdes o azul verdosas

1.2 Enumeración de *Escherichia coli*. β -glucoronidasa positivo

Determinación del NMP de *Escherichia coli* β -glucoronidasa positivo por mL o por g de la muestra, cuando el ensayo es llevado a cabo de acuerdo con la especificación técnica.

2. PRINCIPIO:

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

2.1. Tres tubos¹ de doble concentración con medio líquido de enriquecimiento selectivo son inoculados con una cantidad específica de la muestra ensayada si el producto inicial es líquido, o con una cantidad especificada de la suspensión inicial en el caso de otros productos.

2.2. Tres tubos¹ de simple concentración con medio de enriquecimiento selectivo son inoculados con una cantidad específica de la muestra ensayada si el producto inicial es líquido, o con una cantidad especificada de la suspensión inicial en el caso de otros productos.

Entonces bajo las mismas condiciones, el medio líquido de simple concentración es inoculado con una dilución decimal de la muestra ensayada o de la suspensión inicial.

2.3 Los tubos de doble y simple concentración son inoculados a 37°C por 24h. Los tubos son examinados por la producción de ácido, indicando la fermentación de la lactosa.

2.4. Cada tubo de medio de enriquecimiento selectivo que muestre producción de ácido es subcultivado en Agar glucoronidasa bilis triptona.

2.5 El Agar glucoronidasa bilis triptona, es incubado a 44°C por 20-24h. El Agar glucoronidasa bilis triptona es examinado para la presencia de colonia azules o azules verdosas, indicando la presencia de *Escherichia coli* β- glucoronidasa positivo.

2.6 El NMP *Escherichia coli* β- glucoronidasa positivo es determinado de acuerdo al número de tubos de medio de enriquecimiento selectivo los que han producido en el Agar glucoronidasa bilis triptona colonias azules o azules verdosas.

3. DILUYENTES Y MEDIOS DE CULTIVO

Ver ISO 7218

3.1 Diluyentes

Ver ISO 6687 o ISO 8261

3.2 Medios de cultivo

3.2.1. Medio glutamato minerales modificados (medio de enriquecimiento selectivo)

3.2.2.1 Composición

	a) Medio de doble concentración (g)	b) Medio de simple concentración (g)
Glutamato de sodio	12.7	6.35
Lactosa	20.0	10.0

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

Formato de sodio	0.5	0.25
L- Cistina	0.04	0.02
L-(-) acido aspártico	0.048	0.024
L (+) arginina	0.04	0.02
Tiamina	0.002	0.001
Acido nicotínico	0.002	0.001
Acido pantoténico	0.002	0.001
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.2	0.1
Citrato de amonio hierro (III)	0.02	0.01
Dihidrato de calcio cloruro	0.02	0.01
Dipotasio hidrogeno fosfato	1.8	0.9
Púrpura de bromocresol	0.02	0.01
Cloruro de amonio	5.0	2.5
Agua	1000 mL	1000 mL

3.2.1.2. Preparación

Disolver el cloruro de amonio en agua. Adicionar el remanente de los componentes, o completar los medios deshidratados y disolver por calentamiento de ser necesario.

Para mejorar la estabilidad de almacenamiento de los medios deshidratados, el glutamato de sodio puede ser adicionado separadamente. Ajustar el pH, si es necesario, para que después de la esterilización este $6,7 \pm 0,1$ a 25°C .

Dispensar el medio en volúmenes de 10 mL en tubos de 16 mm x 160 mm en el caso de medio de simple concentración, y los tubos de 18 mm x 180 mm o 20 mm x 200 mm en el caso del medio de doble concentración.

Autoclavar (6.1) por 10 min a 116°C . Alternativamente, calentar a 100°C por 30min por tres días sucesivos

3.2.2. Agar glucoronidasa triptona bilis (segundo medio selectivo)

3.2.2.1 Composición

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

Enzima digerida de caseína (triptona)	20.0 g
Sales biliares N° 3	1.5 g
5-Bromo-4cloro-3indol-β-D-ácido glucoronido (BCIG).....	144 μmol
Dimetil sulfoxide (DMSO) ^b	3mL
Agar	9g a 18 g
Agua.....	1000 mL

- a. Por ejemplo 0.075 g de sales de ciclohexyl amonio
- b. Dimetil sulfoxido es nocivo por inhalación y contacto. Se recomienda el uso de la campana extractora de gases y equipo de protección personal apropiado en la manipulación.
- c. Dependiendo la fuerza de gelificación del agar.

3.2.2.2 Preparación

Disolver el BCIG en el dimetil sulfoxido. Disolver todos los componentes en el agua y calentar hasta ebullición. Ajustar el pH, si fuera necesario, después de la esterilización este toma el valor de $7,2 \pm 0.2$ a 25°C . Esterilizar el medio en autoclave a 121°C por 15 min.

3.2.2.3 Preparación de placas de agar.

Verter de 12 a 15 mL del medio estéril en las placas de petri (6.9) y seguidamente dejar solidificar. Secar las placas (6.3) (ver ISO 7218). Las placas deben de ser almacenadas a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ hasta 5 días.

3.2.3. Pruebas de eficiencia para garantizar la calidad del medio de cultivo

Tabla 1. Prueba de eficiencia del medio glutamato minerales modificado

Función	Incubación	Cepas control	Método de control	Criterio	Reacciones característica
Productividad	37°C /24 h	<i>E. coli</i> ATCC	Semi cuantitativa	Producción de	Cambio de color a amarillo

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

		25922 o 8739		ácido	
Selectividad	37°C /24 h	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 o 19433	Cualitativa	Sin crecimiento	_____

Tabla 2. Prueba de eficiencia del medio Agar TBX

Función	Incubación	Cepas control	Método de control	Criterio	Reacciones característica
Productividad	44°C / 20 h a 24 h	<i>E. coli</i> ATCC 25922 o 8739	Cualitativa	Buen crecimiento	Colonias azules o azul verdosas
Selectividad	37°C /24 h	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 o 19433	Cualitativa	Sin crecimiento	_____

4. APARATOS Y MATERIAL DE VIDRIO

Es una alternativa aceptable el uso de material de vidrio reutilizable si tienen las especificaciones similares.

Los equipos usuales en un laboratorio de Microbiología, y en particular, los que siguen a continuación.

4.1 Aparato de esterilización con calor seco (estufa) o por esterilización con calor húmedo (autoclave) Ver ISO 7218.

4.2 Incubadoras, de capacidad de operación a 37°C ± 1°C y 44°C ± 1°C

4.3 Cabina de secado o estufa con ventilación capaz de mantener la temperatura entre 25°C ± 1°C y 50°C ± 1°C o una cabina de flujo laminar

4.4 Refrigerador (para el almacenamiento de medios preparados) capacidad de operación a 5°C ± 3°C

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

4.5 El pH metro que tenga una resolución de 0,01 unidades de pH y dentro de $\pm 0,1$ unidades de pH a 25°C. El pHmetro debe de estar bien equipado con su manual o su ecualizador de temperatura automático.

4.6 Tubos de prueba, con dimensiones aproximadamente de 16mm x 160mm y 18mm x 180mm o 20mm x 200mm.

4.7 Pipetas con capacidades de 1ml y de 10 ml, graduadas en divisiones de 0,1 ml.

4.8 Asas de siembra, hechas de platino/iridium o de níquel/cromo, aproximadamente 3mm de diámetro, o asas de siembra estériles de 10 μ L.

4.9 Placas Petri de aproximadamente 90 mm de diámetro.

5. MUESTREO.

Al laboratorio debe de ser enviado una muestra representativa. Esta no debe de ser dañada ni cambiada durante el transporte o el almacenamiento. La muestra no es parte del método especificado en esta Especificación Técnica. Si no hay una especificación en el Estándar Internacional sobre el muestreo del producto correspondiente, es recomendable que las partes concernientes lleguen a un acuerdo en este tema.

6. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Prepare la muestra para la prueba de acuerdo al Estándar Internacional. Si no hay una especificación en el Estándar Internacional, es recomendable que las partes concernientes lleguen a un acuerdo en este tema.

7. PROCEDIMIENTO

7.1 Porción del análisis, suspensión inicial y diluciones

Ver la parte apropiada del ISO 6887 y las especificaciones de Estándar Internacional para el producto concerniente. Prepare el suficiente número de diluciones para asegurar que todos los tubos hasta q la dilución final pueda ser un resultado negativo.

7.2 Inoculación y Enriquecimiento selectivo

7.2.1. Para todos los casos en general, se sigue el procedimiento específico de tres tubos por cada dilución. Para mariscos vivos, u otros productos especiales, y/o siempre que una exactitud de los resultados sea necesaria, será necesario inocular una serie de cinco tubos por dilución.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

7.2.2. Tome tres tubos de doble concentración del medio de enriquecimiento selectivo (5.2.1.1.a). Usando una pipeta estéril (6.7) transfiera 10 mL de la muestra líquida, o 10 mL de la suspensión inicial en el caso de otros productos.

7.2.3. Tome tres tubos de simple concentración del medio de enriquecimiento selectivo (5.2.1.1.b). Usando una pipeta estéril (6.7) transfiera 1mL de la muestra líquida, o 1ml de la suspensión inicial en el caso de otros productos.

7.2.4. Para las otras diluciones (de 10^{-1} o 10^{-2} de acuerdo con la muestra) proceder como en 7.2.5. Use una pipeta estéril para cada dilución. Homogenizar cuidadosamente el inóculo y el medio.

7.3. Incubación

Incuba los tubos de doble concentración del medio selectivo y los tubos de simple concentración en una incubadora de 37°C por $24 \pm 2\text{h}$.

7.4. Subcultivo

De cada tubo incubado que muestra la presencia de acidez, indicado por la presencia de una coloración amarilla, subcultive con una asa de siembra (6.8) a una placa de Agar glucoronidasa tripton bilis (5.2.2) y estriar hasta obtener colonias aisladas.

7.5 Segunda Incubación

Incuba las placas inoculadas como en 9.4 por 20h a 24h en una incubadora (6.2) a 44°C . No amontone más de tres placas hacia arriba.

7.6 Examinación de las placas

Después del periodo de incubación (9.5), examine las placas, la presencia de colonias mostrando una sombra de azul oscuro o claro o azul-verdoso, indican la presencia de *Escherichia coli* β -glucoronidasa positiva.

7.7. Interpretación

Considerar como positivo cada tubo de doble o simple concentración del medio enriquecido incubado de acuerdo a 9.3 que ha dado un crecimiento, después del subcultivo, la presencia de colonias azules o azul-verdosas en el medio selectivo. Por cada dilución cuente el número de tubos positivos del medio.

8. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

Calcule el Numero Mas Probable del número de tubos positivos de cada dilución.

Ver ISO 7218

9. PRECISIÓN

Es bien conocido que amplias variaciones en los resultados pueden ocurrir con la técnica del Número más Probable usando tres tubos por dilución. Los resultados obtenidos con este método deben de ser usados por lo tanto con precaución. Cuando se usan series de cinco tubos, la precisión que se obtiene con este reporte puede ser comparable al método de conteo por colonia. Los límites de confianza son dados en el ISO 7218.

10. REPORTE DEL ENSAYO.

El reporte de la prueba debe de especificar:

- a) Toda la información necesaria para la identificación de la muestra;
- b) El método de muestreo usado, si se conoce;
- c) El método de análisis, con referencia en la especificación técnica;
- d) Todos los detalles que no están especificados en la especificación técnica, o considerado como opcional, junto con detalles de algún incidente el cual pueda influenciar en (los) resultado(s);
- e) El (los) resultado(s) obtenido(s), o si la repetibilidad ha sido chequeada, el final del resultado citado obtenido

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

SECCIÓN IV. ENUMERACIÓN DE BACTERIA COLIFORMES Y DE *ESCHERICHIA COLI*

Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria. Bacteriological Analytical Manual on Line. FDA. September 2002. Chapter 4. A- D, E, F. 1995.

ENSAYO : NUMERACION DE BACTERIAS COLIFORMES Y DE *Escherichia coli*
MÉTODO CONVENCIONAL DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP)

PRODUCTO : HARINA DE PESCADO
PRODUCTOS PESQUEROS FRESCOS, REFRIGERADOS O CONGELADOS

REFERENCIA:
MERCK (2000). Microbiology Manual. MERCK KGaA, Darmstadt, Germany. p.p.376, 382 y 387.

Escherichia coli, originalmente conocido como bacteria coli, fue identificado en 1885 por el pediatra alemán, Theodor Escherich. *E. coli* se distribuye extensamente en el intestino de seres humanos y animales de sangre caliente, es el anaerobio facultativo predominante en el intestino y la parte de la flora intestinal esencial que mantiene la fisiología del hospedero sano. *E. coli* es un miembro de la familia de las Enterobacteriaceae, que incluye muchos géneros, incluyendo patógenos conocidos tales como *Salmonelas*, *Shigella*, y *Yersinia*. Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* no se conocen como patógeno, ellas pueden ser patógenos oportunistas que causan infecciones dentro del paciente inmuno comprometido. Hay también cepas patógenas de *E. coli* que al ser ingeridas, causan enfermedad gastrointestinal en seres humanos sanos.

En 1892, Shardingger propuso el uso de *E. coli* como indicador de contaminación fecal. Se basó en la premisa que *E. coli* es abundante en heces humanas y animales y generalmente no hallada en otros lugares. Además, desde entonces *E. coli* podría ser detectada fácilmente por su capacidad de fermentar la glucosa (más adelante cambian a la lactosa), fue más fácil aislar al saber que el patógeno es gastrointestinal. Por lo tanto, la presencia de *E. coli* en alimento o agua se aceptó como indicador de reciente contaminación fecal y posible presencia de bastos patógenos. Si bien el concepto de usar *E. coli* era como indicador indirecto del riesgo a la salud, en la práctica fue complicado, debido a la presencia de otras bacterias entéricas como *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter* que también puede fermentar la lactosa y son similares a *E. coli* en características fenotípicas, de modo que no son fácilmente de distinguirlos.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

Consecuentemente, el término "*coliformes*" fue fijado para describir este grupo de bacterias entéricas. Coliformes no es una clasificación taxonómica, sino alguna definición de trabajo usada para describir un grupo de bacterias Gram-negativas, anaerobias facultativas, formas rectas que fermenta la lactosa para producir ácido y gas dentro de 48 h a 35°C. En 1914, el servicio de salud pública de ESTADOS UNIDOS adoptó la enumeración de coliformes como el estándar más conveniente del significado sanitario.

Aunque los coliformes eran fáciles de detectar, su asociación con contaminación fecal era cuestionable porque algunos coliformes se encuentran naturalmente en muestras ambientales. Esto condujo a la introducción de los coliformes fecales como indicador de contaminación. Coliformes fecales, basado primero en los trabajos de Eijkman es definido de un subconjunto de coliformes totales que crece y fermenta la lactosa en elevada temperatura de incubación, por lo tanto también designados coliformes termotolerantes. Los análisis de coliformes fecales para el alimento se hacen pruebas en 45.5°C, a excepción del agua, los análisis de agua de los mariscos y de la producción de mariscos, que utilizan 44.5°C. El grupo de coliformes fecales consiste sobre todo en *E. coli* pero alguno otros entéricos tal como *Klebsiella* puede también fermentar la lactosa en estas temperaturas y por lo tanto, considerada como coliformes fecales. La inclusión de *Klebsiella spp* en la definición de trabajo de coliformes fecales disminuyó la similitud de este grupo con la contaminación fecal. Consecuentemente, *E. coli* ha emergido como indicador, facilitado en parte por la introducción de nuevos métodos que puedan identificar rápidamente *E. coli*.

Actualmente, los 3 grupos son usados como indicadores pero en diversas aplicaciones la detección de coliformes es usada como indicador de calidad sanitaria del agua o como indicador general de condición sanitaria en el ambiente de procesamiento de alimentos. Los coliformes fecales siguen siendo el indicador estándar de elección para las aguas de los mariscos y la cosecha de los mariscos; y el *E. coli* se utiliza para indicar la reciente contaminación fecal o el proceso antihigiénico. Casi todos los métodos detectaban *E. coli*, coliformes totales o los coliformes fecales son los métodos de la enumeración que se basan en la fermentación de la lactosa. El número más probable (NMP) es un método estadístico, consiste en multi-pasos de análisis de las fases presuntivas, confirmadas y terminadas. En el análisis, las diluciones seriadas de una muestra son inoculadas en caldo. Los analistas anotan el número de tubos de gas positivos (fermentación de la lactosa), de los cuales las otras 2 fases del análisis se realizan y en tal caso utilizan las combinaciones de resultados positivos para consultar las tablas estadísticas (Anexo 3), para estimar el número de organismos presentes. Caracterizando solamente las primeras 2 fases se realizan los análisis de coliformes y coliformes fecal, mientras que todas las 3 fases se hacen para *E. coli*. La prueba del NMP 3-tubos se utiliza para probar la mayoría de los alimentos. El NMP de 5-tubos se

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

utiliza para el análisis de agua, los estanques de agua y cultivo de los mariscos y por ultimo el método de NMP de 10-tubos que se utiliza para analizar el agua embotellada o muestras que no se espera que estén altamente contaminadas.

Método Convencional Para Los Coliformes, Coliformes Fecales Y *E. Coli*

1. Equipo y Materiales

- Baño de agua con tapa, con el sistema de recirculación para mantener la temperatura $45,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. El nivel del agua debe estar encima del nivel del medio en los tubos sumergidos.
- Termómetro tipo inmersión, de 1 - 55°C , cerca de 55 centímetros de largo, con las subdivisiones de $0,1^{\circ}\text{C}$, certificado por el National Institute of Standards and Technology (NIST), o equivalente.
- Incubadora, $35 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$
- Balanza con capacidad de ≥ 2 kilogramos y sensibilidad de 0,1 g.
- Homogenizador y jarra de homogenizador (ver F capítulo 1).
- Pipetas estériles graduadas de, 1,0 y 10,0 mL.
- Utensilios estériles para la toma de la muestra (ver capítulo 1).
- Botellas de dilución hechas de vidrio de borosilicato, con tapas roscas de polietileno equipados con rebordes de Teflón. Comercialmente las botellas de dilución preparadas que contienen fosfato de Butterfield estéril también pueden ser utilizadas.
- pH metro

2. Medios y reactivos

- Caldo Lauril triptosa (LST: Lauryl Sulfate Trytose)
- Caldo bilis lactosa verde brillante (BGLB: Brilla), 2%
- Caldo EC
- Agar Eosina- Azul de Metileno de Levine (L-EMB: Eosin Methylene Blue)
- Caldo Triptona (Triptofano)
- Caldo MR-VP (MR-VP: Methyl Red Voges Proskauer)
- Caldo Citrato de Koser
- Agar de recuento en placas (PCA: Plate Count Agar) (métodos estándares)
- Agua fosfatada-buferada de Butterfield o diluyente equivalente ; agua peptonada (a excepción de los mariscos).
- Reactivo de Kovacs
- Reactivo de Voges-Proskauer (VP)
- Indicador rojo de metilo
- Reactivos de coloración Gram

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

3. NMP-Prueba presuntiva para coliformes, coliformes fecales y E. coli

Pese 50 g de alimento en el frasco estéril del homogenizador de gran velocidad. (Ver Capítulo 1 y la aprobación del FDA al programa actual para las instrucciones en el tamaño de la muestra y composito) Las muestras congeladas pueden ser ablandadas almacenándolas por ≤ 18 h entre 2-5°C, pero no deshelar. Agregue 450 mL del agua fosfato-bufferado de Butterfield y mezcle por 2 minutos. Si la muestra disponible es < 50 g, pese la porción de la muestra que es equivalente a la mitad y adicione el volumen suficiente de diluyente estéril para hacer una dilución 1:10. El volumen total debe cubrir totalmente las cuchillas del vaso del mezclador.

Prepare las diluciones decimales con el diluyente del fosfato de Butterfield estéril. El número de las diluciones que se prepararán depende de la densidad anticipada de coliformes. Agitará todas las suspensiones 25 veces en arco de 30 centímetros o mezclar en el vortex por 7 s. No use pipetas con una medida de entrega $< 10\%$ de su volumen total. Transferir porciones de 1 mL a 3 tubos de LST para cada dilución por lo menos para 3 diluciones consecutivas. Sostener la pipeta en un ángulo de modo que su borde más bajo se recline contra el tubo. Permita que la pipeta escurra 2-3 s. No debe transcurrir más de 15 minutos, deben transcurrir a partir del tiempo que se mezcla desde que la muestra es homogeneizada dentro de las diluciones hasta su inoculación en el medio apropiado.

NOTA: Utilice NMP de 5-tubos para analizar mariscos y el agua de cultivo de mariscos

Incube los tubos de LST a 35°C. Examinar los tubos y registrar la formación de gas a las 24 ± 2 h, es decir, desplazamiento del medio en tubos de fermentación o efervescencia al agitar suavemente los tubos. Incube los tubos gas-negativo por 24 h adicionales, examínelos y registre las reacciones a las 48 ± 2 h. Realice otra vez la prueba confirmativa en todos los tubos presuntos (de gas) positivos.

4. NMP- Prueba Confirmativa Para Los Coliformes

De cada tubo de LST con gas, transferir una asada de la suspensión a un tubo de caldo de BGLB, evitar la película si está presente. Incube los tubos de BGLB a 35°C y observe la producción de gas a las 48 ± 2 h. Calcular (NMP) el número mas probable (ver el Anexo III) de los coliformes basados en la proporción de tubos con gas confirmados de LST para las 3 diluciones consecutivas.

5. NMP- Prueba Confirmativa Para Los Coliformes Fecales Y E. coli

Para cada tubo de LST con gas de la prueba presuntiva, transferir una asada de cada suspensión a un tubo de caldo EC (se puede usar como aplicador para estas transferencias un hisopo de madera estéril). Incube los tubos de EC por 24 ± 2 h a

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

45,5 °C y examine la producción del gas. Si es negativo, reincube y examine otra vez a las 48 ± 2 h. El uso de esta prueba es para calcular el resultado del NMP de Coliformes Fecales. Para continuar con el análisis del E. coli, proceder como en la sección F. El método NMP con caldo EC puede ser usado para el agua de mar y los mariscos puesto que satisface los procedimientos recomendados. (Precaución: ver nota abajo).

NOTA: Los análisis de Coliformes Fecales se realiza a 45.5 ± 0.2°C para todos los alimentos. A excepción del análisis de aguas, mariscos y agua del cultivo de mariscos, que emplean una temperatura de incubación de 44.5 ± 0.2°C.

6. NMP- Prueba Completada Para E. coli.

Para realizar la prueba completa para E. coli, agite suavemente cada tubo de EC con gas y señálese para el aislamiento, coloque una asada en una placa de agar de L-EMB e incube por 18-24 h en 35°C. Examine las placas con colonias sospechosas de E. coli, es decir, centro oscuro y plano, con o sin brillo metálico. Transferir hasta 5 colonias sospechosas de cada placa de L-EMB a tubos de PCA en plano inclinado, incube por 18-24 h en 35°C y mas utilícelas en prueba adicionales.

NOTA: La identificación de 1 de las 5 colonias como E. coli es suficiente para considerar el tubo de EC como positivo; por lo tanto, no todas los 5 colonias podrían necesitar ser evaluadas.

Realice la coloración Gram. Todos los cultivos que aparecen como bacilos Gram-negativo, cortos deberían ser evaluados por reacciones de IMVIC abajo detalladas y además reinocular nuevamente dentro de LST para confirmar la producción de gas.

Producción de indol. Inocule al tubo de caldo Triptona e incube 24 ± 2 h a 35°C. Realice la prueba de Indol añadiendo 0,2-0,3 mL del reactivo de Kovacs. La aparición de una capa de color rojo en la superficie es prueba positiva.

Prueba de Voges-Proskauer (VP) Inocule al tubo de caldo MR.-VP e incube 48 ± 2 h a 35°C. Transfiera 1 mL a un tubo de 13 x 100 milímetros. Agregue 0,6 mL solución de α - naftol y 0,2 mL de KOH al 40%, y agitar. Agregue algunos cristales de creatina. Agite y observe a las 2 h. La prueba es positiva si se convierte al color rosado de la eosina.

Prueba de Rojo de Metilo Después de prueba de VP, incube los tubos de MR-VP adicionalmente por 48 ± 2 h a 35°C. Agregue 5 gotas de la solución de Rojo Metilo a cada tubo. La prueba es positiva a la aparición de un color rojo distintivo y negativa a la aparición de color amarillo.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

Prueba de Citrato. Inocule ligeramente al tubo de caldo Citrato de Koser; evite visible turbiedad. Incube por 96 h a 35°C. El desarrollo de una turbidez distintiva determina la reacción como positiva.

Producción de gas a partir de lactosa. Inocule a un tubo de LST e incube por 48 ± 2 h a 35°C. La producción de gas (desplazamiento del medio del vial interno) o efervescencia después de la ligera agitación se trata de reacción positiva.

Interpretación: Todos los cultivos que (a) fermenten lactosa con producción de gas dentro de 48 h a 35°C, (b) se presenta como bacilos de formas no esporuladas Gram-negativas y (c) dé los modelos de IMViC de +++-(biotipo 1) o - +--(biotipo 2), considerarlos como *E. coli*. Calcule el NMP (vea Anexo III) de *E coli* basado en la proporción de tubos de EC en 3 diluciones sucesivas que contengan *E coli*.

NOTA: Alternativamente, en lugar de realizar la prueba de IMViC, utilice API20E o el análisis bioquímico automatizado de VITEK para identificar el organismo como *E. coli*. Utilice el crecimiento de los tubos en plano inclinado de PCA y realice estos ensayos según lo descrito por el fabricante.

7. Reactivos y medios de cultivo:

7.1. Caldo Lauril Triptosa (LST: Lauryl Sulfate Tryptose)

Triptosa o Tripticasa	20 g
Lactosa	5 g
K ₂ HPO ₄	2,75 g
KH ₂ PO ₄	2,75 g
NaCl.....	5 g
Lauril Sulfato de Sodio	0,1 g
Agua destilada.....	1 litro

Dispensar porciones de 10 mL a tubos de 20 x 150 mm conteniendo tubos de fermentación invertidos de 10 x 75 mm. Autoclavar por 15 min a 121 °C. El pH final debe ser de 6,8 ± 0,2.

7.2. Caldo Bilis Lactosa Verde Brillante (BGLB: Brilliant Green Lactose Bile)

Peptona ³	10 g
----------------------------	------

³ De acuerdo al Microbiology Manual. MERCK (2000) p.p.382 Peptona (Difco) equivale a peptona de carne (Merck).

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

Lactosa	10 g
Sales biliares.....	20 g
Verde brillante	0,0133 g
Agua Destilada	1 litro

Disolver la peptona y la lactosa en 500 mL de agua destilada. Agregar 20 g de sales biliares deshidratadas y disolver en 200 mL de agua destilada. El pH de esta solución debe estar entre 7,0-7,5. Mezclar y agregar agua hasta alcanzar 975 mL. Ajustar el pH a 7,4. Agregar 13,3 mL de verde brillante al 0,1% en agua destilada. Añadir agua destilada para llevar a 1 litro. Distribuir en tubos de fermentación asegurándose que el nivel del medio cubra los viales de fermentación invertidos. Esterilizar por 15 min a 121°C. El pH final debe ser 7,2 ± 0,1.

7.3. Caldo Escherichia coli (EC: Escherichia coli)

Tripticasa o Triptosa ⁴	20 g
Sales biliares N° 3	1,5 g
Lactosa.....	5 g
K ₂ HPO ₄	4 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
NaCl	5 g
Agua destilada.....	1 litro

Distribuir en porciones de 8 mL en tubos de 16 x 150 mm conteniendo tubos de fermentación invertidos de 10 x 75 mm. Autoclavar por 15 minutos a 121°C. El pH final debe ser de 6,9 ± 0,2.

7.4. Agar Eosina Azul de Metileno acc. Levine (EMB: Eosin Methylene Blue)

Peptona.....	10 g
Lactosa.....	10 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Agar.....	15 g
Eosina Y.....	0,4 g
Azul de Metileno.....	0,065 g
Agua destilada.....	1 litro

Hervir hasta disolver la peptona, el fosfato y el agar en 1 litro de agua. Añadir agua destilada hasta obtener el volumen original. Dispensar en porciones de

⁴ De acuerdo al Microbiology Manual. MERCK (2000) p.p.376 Tripticasa peptona (BBL) equivale a peptona de caseína pancreática granulada (Merck).

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

100 o 200 mL y autoclavar 15 minutos no sobrepasando los 121 °C. El pH final debe ser $7,1 \pm 0,2$.

Licuar el medio antes de usarlo y por cada porción de 100 mL añadir: (a) 5 mL de una solución de lactosa al 20%, estéril; (b) 2 mL de una solución acuosa de eosina Y al 2 %; y finalmente (c) 4,3 mL de una solución acuosa de azul de metileno al 0,15 %.

Cuando use un producto comercial deshidratado, hervir hasta disolver todos los ingredientes en 1 litro de agua. Dispensar en porciones de 100 o 200 mL y autoclavar a 121°C durante 15 minutos. El pH final debe ser $7,1 \pm 0,2$.

7.5. Caldo Triptona (Tryptofano) al 1%

Triptona o Tripticasa10 g
Agua destilada1 litro

Disolver y dispensar en porciones de 5 mL en tubos de 16 x 125 mm o de 16 x 150 mm. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos. El pH final debe ser $6,9 \pm 0,2$.

7.6. Caldo MR-VP (MR-VP: Methyl-Red Voges-Proskauer)

Medio 1

Agua Peptonada Tamponada en polvo (Difco o BBL)7 g
Glucosa5 g
K₂HPO₄5 g
Agua destilada1 litro

Medio 2

Digestión Pancreática de Caseína3,5 g
Digestión Péptica de Tejido Animal3,5 g
Glucosa (Dextrosa)5,0 g
Fosfato de Potasio5,0 g
Agua destilada1 litro

Disolver los ingredientes en agua con calor moderado si fuera necesario. Distribuir 10 mL en tubos de ensayo de 16 x 150 mm a autoclavar por 15 minutos a 118-121 °C. El pH final debe ser $6,9 \pm 0,2$.

Medio 3

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

Peptona.....	5 g
Glucosa	5 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Agua destilada.....	1 litro

Disolver los ingredientes en agua. Dispensar 10 mL en tubos de ensayo de 16 x 150 mm y autoclavar por 15 minutos a 121 °C. El pH final debe ser 7,5 ± 0,2.

7.7. Caldo Citrato de Koser

NaNH ₄ HPO ₄ . 4 H ₂ O.....	1,5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O.....	0,2 g
Citrato de Sodio. 2H ₂ O	3 g
Agua destilada.....	1 litro

Dispensar en tubos con tapa rosca en la medida requerida. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos. El pH final debe ser 6,7 ± 0,2. Esta formulación aparece listada en los Official Methods of Analysis de AOAC, y en los Standard Methods for the Examination of Wastewater de APHA. Sin embargo, esta composición difiere de la de los medios deshidratados comerciales. Se ha encontrado, no obstante, que dichos medios tienen un desempeño satisfactorio.

7.8. Agar Recuento en Placa (PCA: Plate Count Agar)

Triptona ⁵	5 g
Extracto de levadura	2,5 g
Glucosa	1 g
Agar.....	15 g
Agua destilada.....	1 litro

Calentar hasta disolver los ingredientes. Distribuir en tubos o frascos adecuados. Autoclavar durante 15 min a 121°C. El pH final debe ser 7,0 ± 0,2.

Para Mohos y Levaduras Viables: Distribuir porciones de 20-25 mL en placas Petri estériles de 15 x 100 mm.

⁵ De acuerdo al Microbiology Manual. Merck (2000) p.p.387, Triptona (Oxoid) equivale a Peptona de caseína (pancreática) (Merck).

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

7.9. Reactivo de Kovacs

p-dimetil Amino Benzaldehido.....	5 g
Alcohol Amílico (sólo normal).....	75 mL
HCl (concentrado).....	25 mL

Disolver el p-dimetil amino benzaldehido en alcohol amílico normal. Agregar lentamente el HCl. Almacenar a 4°C.

Para la prueba del indol, agregar 0,2-0,3 mL del reactivo a 5 mL de un cultivo bacteriano con 24 h de crecimiento en Caldo Triptona. La formación de un anillo rojo en la superficie del medio indica una prueba positiva para el indol.

7.10. Reactivos de Voges-Proskauer

Solución 1:

α -Naftol.....	5 g
Alcohol (absoluto).....	100 mL

Solución 2:

Hidróxido de Potasio.....	40 g
Agua destilada	c.s.p. 100 mL

Prueba de Voges-Proskauer:

Transferir 1 mL de un cultivo que tiene 48 horas de crecimiento a un tubo de ensayo y añadir 0,6 mL de la Solución 1 y 0,2 mL de la Solución 2.

Agitar después de añadir cada reactivo. Para intensificar y acelerar la reacción, añadir unos cuantos cristales de creatina a la mezcla y dejar reposar a temperatura ambiente.

Leer los resultados después de 4 horas de añadir los reactivos. El desarrollo de un color rosado indica una reacción positiva.

7.11. Reactivo Indicador Rojo de Metilo

Rojo de Metilo	0,10 g
Etanol, 95%.....	300 mL
Agua destilada.....	c.s.p. 500 mL

Disolver el rojo de metilo en 300 mL etanol y agua destilada hasta completar 500 mL.

7.12. Reactivos para la Tinción de Gram

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

1. Solución Cristal Violeta de Hucker:

Solución A:

Cristal violeta (contenido de colorante: 90%)2 g
Etanol, 95%.....20 mL

Solución B:

Oxalato de Amonio.....0,8 g
Agua destilada.....80 mL

Mezclar las soluciones A y B. Almacenar 24 horas y filtrar a través de papel filtro grueso.

2. Solución Yodada de Gram:

Yodo..... 1 g
Yoduro de Potasio (KI) 2 g
Agua destilada..... 300 mL

Colocar el yoduro de potasio en un mortero, agregar el yodo y moler bien por 5-10 segundos. Agregar 1 mL de agua y seguir moliendo; agregar luego 5 mL de agua y moler nuevamente para finalmente añadir 10 mL más y volver a moler. Verter esta solución dentro del frasco final en que se habrá de almacenar el reactivo (frasco oscuro). Enjuagar el mortero y mazo con una cantidad de agua suficiente para alcanzar un volumen total de 300 mL.

3. Solución de Contraste de Hucker (Solución Patrón)

Safranina O (certificada).....2,5 g
Etanol, 95%.....100 mL
Agregar 10 mL de la Solución Patrón a 90 mL de agua destilada.

4. Procedimiento ("Tinción de Gram")

- a. Fijar las láminas de la muestra de alimento al aire y en calor moderado.
- b. Teñir la lámina durante 1 minuto con la Solución de Cristal Violeta-Oxalato de Amonio. Lavar rápidamente la lámina en agua de grifo y escurrir.
- c. Aplicar la Solución Yodada de Gram durante 1 minuto, Lavar en agua de grifo y escurrir.
- d. Decolorar la lámina con etanol al 95% hasta el alcohol que fluya no coloree de azul (aproximadamente unos 30 segundos). Alternativamente, puede sumergirse la lámina en etanol, verter inmediatamente e inundarlas nuevamente con etanol por unos 10 segundos.
- e. Lavar brevemente con agua, escurrir y aplicar la Solución de Contraste de Hucker (solución de safranina) por 10 a 30 segundos. Lavar brevemente

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

con agua, escurrir y secar al aire para posteriormente examinar la lámina al microscopio.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

SECCIÓN V. TÉCNICA DE TUBOS MÚLTIPLES DE FERMENTACIÓN PARA LOS MIEMBROS DEL GRUPO COLIFORMES Y COLIFORMES FECALES.

Procedimiento para coliformes fecales 9221 E - 2. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18th. Edition 1992.

Parte .1

- ENSAYO** : Numeración de coliformes fecales.
- PRODUCTO** : Agua, Agua de mar
- REFERENCIA** : *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18th. Edition 1992.*

Las evaluaciones a elevada temperatura para distinguir organismos del grupo de coliformes totales al cual también pertenece el grupo de coliformes fecales se describen a continuación. Las modificaciones en las técnicas, estandarización de métodos, y el estudio detallado del grupo de coliformes fecales han establecido el valor de este procedimiento. La evaluación puede ser realizada por el procedimiento de tubos múltiples descrito aquí o por el método de filtro de membrana como se describe en la sección 9222. El procedimiento que utiliza el Caldo A - 1 es un método de un solo paso.

La evaluación de coliformes fecales (utilizando Medio EC) es aplicable en la evaluación de agua para beber, vapor de polución, fuentes de agua cruda, sistemas de aguas tratadas, aguas de piscinas, agua de mar, agua de calidad en general. Se requiere la utilización de un previo enriquecimiento para la recuperación óptima de coliformes fecales cuando se utiliza medio EC. La evaluación con Medio A - 1 es aplicable a aguas de fuentes, agua de mar y aguas residuales tratadas.

1. Equipos y Materiales.

- Autoclave a 121 °C.
- Tubos con tapa de 150mm x 15 mm
- Campanas de durham
- Incubadora a 35 ± 0.5 °C.
- Baño termostático a 44.5 ± 0.2 °C.
- Gradilla para tubos
- Frascos estériles de 250 mL de vidrio autoclavable. Con tapas de goma o tapa rosca
- Pipetas con bombillas o pipeteadores de 10 mL, 1 mL, graduadas en unidades de 0.1 mL.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

2. Medios y Reactivos.

- Caldo A - 1.
- Lactosa
- Triptona
- Cloruro de sodio
- Salicina
- Eter Polietilen glicol p - isooctilfenil # 1
- Agua grado reactivo

3. Procedimiento.

- Inocule tubos con caldo A -1 como se muestra en la sección 9221B.1b1
- Colocar tubos de fermentación en filas de 5 o 10 tubos cada uno en una gradilla. El número de filas y el volumen de la muestra seleccionada depende de la calidad y características del agua a evaluar. Para agua potable utilizar 5 tubos de 20 mL, 10 de 10 mL o una botella de 100 mL. Para agua no potable 5 tubos por dilución (de 10, 1, 0.1 mL, etc). Para realizar las diluciones y medir los volúmenes de muestra diluida, seguir las precauciones consideradas en la Sección 9215B.2. Utilice la figura 9215:1 como guía para la preparación de diluciones. Homogenizar la muestra y las diluciones vigorosamente 25 veces. Inocule cada tubo en un grupo de 5 con volúmenes de muestra duplicadas (aumentar las diluciones decimales, si se utiliza cantidades decimales de la muestra). Mezclar las pruebas a evaluar en el medio mediante agitación en aumento. (Sección 9221B.1b1)
- Incube por 3 horas a 35 ± 0.5 °C.
- Coloque los tubos en un baño de agua a 44.5 ± 0.2 °C e incube por un tiempo adicional de 21 ± 2 horas.

4. Interpretación (Cálculo y reporte de coliformes fecales).

La producción de gas en caldo A - 1 cultivado por 24 horas o menos es considerado como reacción positiva para la presencia de coliformes fecales. Calcular el NMP del número de tubos positivos del caldo A - 1 como se describe en 9221C.

5. Reactivos Y Medios de Cultivo.

1. Caldo A-1 (Medio A-1)

Lactosa5 g

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

Tryptona	20 g
Cloruro de sodio	5 g
Salicina.....	0.5 g
Polietilen glicol p-isooctilfenil eter N° 1.....	1.0 mL
Agua grado reactivo	1 litro

Calentar hasta disolver los ingredientes sólidos, adicionar el eter polietilen glicol p - isooctilfenil, ajustar el pH a $6.9 \pm 0,1$. Antes de esterilizar dispensar en tubos de fermentación con vial invertido cubierto con una cantidad suficiente de medio para cubrir el vial invertido al menos parcialmente después de la esterilización .

Cerrar con tapas de metal o de plástico resistentes al calor. Esterilizar por autoclavado a 121 °C por 10 minutos. Almacenar en oscuridad a temperatura ambiente por no más de 7 días. Ignorar el precipitado.

El caldo A -1 preparado para la adición de 10 mL de muestra al medio no debe reducir la concentración de ingredientes del medio standard. Para la adición de 10 mL de muestra prepare medio a doble concentración.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

**SECCIÓN VI. DETECCIÓN DE *Salmonella*.
Internacional Standard ISO 6579: 2002**

ENSAYO : Detección de *Salmonella spp*
PRODUCTO : Productos hidrobiológicos
REFERENCIA : *Método horizontal para la detección de Salmonella spp (ISO 6579:2002)*

INTRODUCCIÓN

Dada la gran variedad existente de productos alimenticios destinados al consumo humano y animal este método horizontal puede no ser completamente aplicable para ciertos productos. En estos casos, se pueden usar diferentes métodos, específicos para estos productos, si está absolutamente justificado por razones técnicas. Sin embargo, se debería intentar aplicar este método horizontal siempre que sea posible.

Cuando se revise esta norma internacional, se tendrá en cuenta toda la información disponible en ese momento, sobre la aplicación de este método y las razones que han originado desviaciones para productos concretos.

La armonización de los métodos de ensayo no puede ser inmediata, y para ciertos grupos de productos pueden existir ya normas internacionales o nacionales que no se ajusten a este método horizontal. Se espera que cuando esas normas se revisen, se cambien para que se ajusten a esta parte de la Norma ISO 6579 y que sólo se conserven las divergencias inevitables justificadas por razones técnicas.

PRECAUCION — Con el fin de proteger la salud del personal del laboratorio, es esencial que los análisis para detectar *Salmonella* y, en especial *Salmonella Typhi* y *Salmonella Paratyphi*, se realicen exclusivamente en laboratorios con equipamiento adecuado, bajo la supervisión de microbiólogos cualificados y, que se dedique una atención especial a la eliminación de todos los materiales que han sido incubados.

1. ALCANCE

Esta norma internacional describe un método horizontal para la detección de *Salmonella*, incluyendo *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi*,

Sujeta a las limitaciones discutidas en la introducción esta norma internacional es aplicable a:

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

- los productos para consumo humano o animal;
- las muestras ambientales en el área de la producción y manipulación de alimentos.

PRECAUCION — Este método puede no recuperar todas las *Salmonella Typhi* y *Salmonella Paratyphi*.

2. REFERENCIAS NORMATIVAS

Las normas que a continuación se relacionan contienen disposiciones válidas para esta norma internacional. En el momento de la publicación estaban en vigor las ediciones indicadas. Toda norma está sujeta a revisión por lo que las partes que basen sus acuerdos en esta norma internacional deben estudiar la posibilidad de aplicar la edición más reciente de las normas indicadas a continuación. Los miembros de CEI y de ISO poseen el registro de las normas internacionales en vigor en cada momento.

ISO 6887-1 — *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 1: Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales.*

ISO 7218:1996 — *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 muestras para análisis, suspensiones iniciales y diluciones decimales para análisis microbiológicos.*

3. TERMINOS Y DEFINICIONES

Para el propósito de este Estándar Internacional, se aplican las definiciones siguientes:

3.1 *Salmonella*: Microorganismos los cuales forman colonias típicas o menos típicas en un medio selectivo y los cuales presentan características bioquímicas y serológicas descritas cuando las pruebas son llevadas en concordancia con esta Norma Internacional.

3.2 Detección de *Salmonella*: Determinación de presencia o ausencia de *Salmonella* (3.1) en una cantidad determinada de masa o volumen de producto, cuando las pruebas son llevadas en concordancia con esta Norma Internacional.

4. PRINCIPIO

4.1 Generalidades

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

La detección de *Salmonella* necesita cuatro etapas sucesivas (véase también el anexo A).

NOTA — Las *Salmonella* pueden estar presentes en números pequeños y, a menudo están acompañadas de números considerablemente mayores de otras *Enterobacteriaceae* o de otras familias. Además, el preenriquecimiento es necesario para permitir la detección de números bajos de *Salmonella* o de *Salmonella* lesionadas.

4.2 Pre enriquecimiento en medio líquido no selectivo

Inoculación de la muestra en agua bufferada tamponada (también usada como diluyente) con la porción de muestra e incubarlo a 37°C por 18 ± 2 horas.

Para ciertos productos alimenticios es necesario emplear otros procedimientos de pre enriquecimiento. Véase el apartado 9.1.2.

Para grandes cantidades, es conveniente calentar el agua de peptona tamponada a 37 °C ± 1 °C antes de ser sembrada con la porción para análisis.

4.3 Enriquecimiento en medio líquido selectivo

Se siembra el medio Rappaport-Vassiliadis con soya (caldo RVS) y el caldo Muller-Kauffmann tetratratonato/novobiocina (caldo MKTTn) con el cultivo obtenido en el apartado 4.2.

El caldo RVS se incuba a 41,5 °C ± 1 °C durante 24 h ± 3 h y, el caldo MKTTn a 37 °C ± 1 °C durante 24 h ± 3 h.

4.4 Plaqueo y Reconocimiento

De los cultivos obtenidos en 4.3, inocular en dos medios selectivos:

- Agar xilosa lisina desoxicolato (agar XLD);
- Cualquier otro medio selectivo complementario al XLD y que sea especialmente adecuado para el aislamiento de cepas de *Salmonella lactosa* positivas y, *Salmonella Typhi* y *Salmonella Paratyphi*; el medio se deja a la elección del laboratorio.

El agar XLD se incuba a 37 °C ± 1 °C y se examina después de 24 h ± 3 h. El segundo agar selectivo se incuba según las recomendaciones del fabricante.

NOTA — Para información, el agar verde brillante (BGA), agar sulfito de bismuto, etc., podrían ser utilizados como el segundo medio en placa..

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

4.5 Confirmación e Identidad

Después de sembrarlas en placa como se describió en 4.4, las colonias presuntivas de Salmonela se subcultivan y se confirman mediante pruebas bioquímicas y serológicas.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y SEROLOGIA

5.1 General

Para las prácticas habituales en el Laboratorio, ver ISO 7218

5.2 Medios de cultivo y reactivos

Nota Debido a que existen un gran numero de medios de cultivo y reactivos, se considera preferible para mayor claridad dar su composición y preparación en el anexo B.

5.2.1 Medio de Pre enriquecimiento no selectivo: Agua peptonada bufferada

Ver B.1

5.2.2 Primer medio de enriquecimiento selectivo: Medio Rappaport-Vassiliadis con soya (Caldo RVS)

Ver B.2

5.2.3 Segundo medio de enriquecimiento selectivo: Caldo Muller-Kauffman tetracionato novobiocin (MKTTn)

Ver B.3

5.2.4 Medio sólido selectivo de plaqueo

5.2.4.1 Primer medio: Agar Xilosa lisina desoxicolato (Agar XLD)

Ver B.4.

5.2.4.2. Segundo Medio

La elección del segundo medio se deja a discreción del laboratorio. Es conveniente seguir de manera precisa las instrucciones del fabricante en lo referente a su preparación.

5.2.5 Agar Nutritivo

Ver B.5.

5.2.6 Agar Triple azucar/ hierro (Agar TSI)

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

Ver B.6.

5.2.7 Agar Urea (Christensen)

Ver B.7.

5.2.8. Medio L -Lisina descarboxilación

Ver B.8.

5.2.9. Reactivos para la detección de la β - galactosidasa (o preparación de los discos de papel, usados en acuerdo con las instrucciones del fabricante)

Ver B.9.

5.2.10. Reactivos para el Voges-Proskauer (Reaccion VP)

Ver la B.10.

5.2.11 Reactivos para la reacción de Indol

Ver B.11.

5.2.12 Agar Nutritivo semi-sólido

Ver B.12.

5.2.13. Solución Salina

Ver B.13.

5.3. Serología

Se encuentran disponibles comercialmente varios tipos de sueros que contienen anticuerpos frente a uno o varios antígenos O; es decir antisueros que contienen uno o más grupos "O" (denominados sueros anti O monovalentes o polivalentes), sueros anti Vi, y antisueros que contienen anticuerpos frente a uno o varios factores H (denominados sueros anti H monovalentes o polivalentes).

Conviene hacer todos los esfuerzos para asegurarse que los antisueros empleados son adecuados para la detección de todos los serotipos de *Salmonella*. Con este objetivo se pueden emplear sólo antisueros preparados por un suministrador competente reconocido (por ejemplo, por un organismo gubernamental adecuado).

6. APARATOS Y MATERIAL DE VIDRIO

El material de un solo uso es una alternativa aceptable al material de vidrio reutilizable si las especificaciones son similares.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

6.1 Aparatos para Esterilización en seco (estufa) o esterilización en vapor (autoclave)

Ver ISO 7218.

6.2 Cabina de secado o estufa, ventilada por convección, con capacidad operativa entre 37 °C y 55°C

6.3 Incubadora, con una capacidad operativa de 37 °C ± 1°C

6.4 Baño de agua, con una capacidad operativa en 41,5 °C ± 1 °C o incubadora con una capacidad operativa en 41,5 °C ± 1 °C.

6.5 Baños de agua, con una capacidad operativa de 44°C a 47°C

6.6 Baño de agua, con una capacidad operativa en 37 °C ± 1°C.

Es recomendable emplear un baño de agua (6.4, 6.5 y 6.6) que contenga un agente antibacteriano debido a la baja dosis infectiva de *Salmonella*.

6.7 Asas estériles, de diámetro aproximadamente 3mm o 10 µL, o pipetas estériles.

6.8 pH-metro, teniendo una precisión de calibración de ± 0.1 pH unidades de 20°C a 25°C.

6.9 Tubos de ensayo o matraces, de capacidad apropiada.

Botellas o matraces con tapas de plástico o metálica no toxica pueden ser utilizadas.

6.10 Pipetas graduadas o pipetores automaticos, con capacidades de 10 ml y 1ml, graduadas en divisiones de 0,5 y 0,1 ml respectivamente.

6.11 Placas de petri, de tamaño pequeño (diámetro 90 mm a 100 mm) y/o tamaño grande (diámetro 140 mm).

7. MUESTREO

Es importante que el laboratorio reciba una muestra que sea verdaderamente representativa y que no halla sido dañada o cambiada durante el transporte o almacenamiento.

El muestreo no es parte del método especificado en esta Norma Internacional. Ver la Norma Internacional específica de acuerdo con el producto concerniente. Si no hay una Norma Internacional específica, se recomienda que las partes concernientes lleguen a un acuerdo sobre este tema.

8. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

Preparar la muestra de de acuerdo a la Norma Internacional específica en relación con el producto concerniente. Si no hay Norma Internacional específica, se recomienda que las partes concernientes lleguen a un acuerdo sobre este tema.

9. PROCEDIMIENTO

(Ver diagrama en anexo A).

9.1 Porción de ensayo y suspensión inicial

9.1.1 General

Ver ISO 6887 y la Norma Internacional en relación con el producto concerniente. Ver la ISO 8261 para leche y productos Lácteos.

Para la preparación de la suspensión inicial, utilice como diluyente fluido el medio de pre-enriquecimiento especificado en 5.2.1y 4.2 agua peptonada bufferada).

Si la masa especificada para la porción para análisis no fuera 25 g, se emplea la cantidad necesaria de medio de pre enriquecimiento para obtener una dilución 1/10.

Con el fin de reducir la carga de trabajo cuando haya de analizarse más de una porción para análisis de 25 g de un determinado lote de alimento y, cuando exista evidencia de que su mezcla (juntando las porciones para análisis) no afecta al resultado de ese alimento en particular, las porciones de análisis pueden ser mezcladas. Por ejemplo, si deben analizarse 10 porciones de análisis de 25 g, se combinan las 10 unidades para constituir una porción para análisis compuesta de 250 g y se añaden 2,25 l de caldo de pre enriquecimiento. Una alternativa sería reunir las porciones de 0,1 ml (en 10 ml de caldo RVS) y 1 ml (en 10 ml de caldo MKTTn) de los caldos de pre enriquecimiento provenientes de 10 porciones para análisis separadas (véase el apartado 9.3.1) para enriquecerlas en 100 ml de los medios de enriquecimiento selectivos.

9.1.2 Preparaciones específicas de la suspensión inicial para ciertos productos alimenticios

NOTA — Las siguientes preparaciones específicas se refieren sólo al caso de *Salmonella*. Las preparaciones específicas aplicables a la determinación de cualquier microorganismo se describen en las Normas Internacionales ISO 6887-2, ISO 6887-3, ISO 6887-4 e ISO 8261.

9.1.2.1 Cacao y productos que contienen cacao (por ejemplo, más del 20%).

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

Se añaden, al agua de peptona tamponada (5.2.1), preferiblemente 50 g/1 de caseína (evitar el empleo de caseína ácida), o 100 g/1 de leche desnatada en polvo estéril y se añaden, después de unas 2 h de incubación, 0,018 g/1 de verde brillante si es probable que el producto alimenticio esté muy contaminado con flora Gram positiva.

9.1.2.2 Productos alimenticios ácidos y acidificantes.

Se ha de asegurar que el pH no baje de 4,5 durante el pre enriquecimiento.

NOTA — El pH de los productos alimenticios ácidos y acidificantes es más estable si se emplea agua de peptona tamponada a doble concentración.

9.2 Pre enriquecimiento no selectivo

Se incuba la suspensión inicial (9.1) a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

9.3 Enriquecimiento selectivo

9.3.1 Transferir 0,1 mL del cultivo obtenido en 9.2 a un tubo conteniendo 10 mL del caldo RVS (5.2.2); transferir 1 mL del cultivo obtenido en 9.2 a un tubo conteniendo 10 mL del caldo MKTTn (5.2.3).

9.3.2 Se incuba el caldo RVS sembrado (9.3.1) a $41,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ y el caldo MKTTn sembrado a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$. Hay que tener cuidado de que no se supere la máxima temperatura de incubación permitida ($42,5\text{ }^{\circ}\text{C}$).

9.4 Sembrado en placa e identificación

9.4.1 Tras incubar durante $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$, utilizando el cultivo obtenido en el caldo RVS (9.3.2), se siembra mediante un asa (6.7) la superficie de una placa Petri de tamaño grande (6.11) que contenga el primer medio en placa selectivo (agar XLD, véase el apartado 5.2.4.1), de tal forma que se obtengan colonias bien aisladas.

Si no se dispone de placas grandes, se emplean dos placas pequeñas una después de la otra, utilizando la misma asa.

Se procede de la misma manera con el segundo medio selectivo en placa (5.2.4.2) empleando como anteriormente un asa estéril y placas Petri. 1

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

9.4.2 Tras incubar durante $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$, utilizar el cultivo obtenido en caldo MKTTn (9.3.2), y se repite el procedimiento descrito en 9.4.1 con los dos medios selectivos en placa.

9.4.3 Se invierten las placas (9.4.1 y 9.4.2) dándoles la vuelta y, se colocan en la estufa de incubación (6.3) regulada a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ para el primer medio en placa (5.2.4.1). Para el segundo medio en placa (5.2.4.2) deben seguirse las instrucciones del fabricante.

9.4.4 Después de la incubación de $24 \pm 3 \text{ h}$ examinar las placas (9.4.3) para la presencia de colonias típicas de *Salmonella* y de colonias atípicas que pueden ser *Salmonella* (ver nota). Se marca su posición en la parte inferior de la placa.

Las colonias típicas de *Salmonella* que crecen en el agar XLD tienen un centro negro y una zona ligeramente transparente de color rojizo debido al cambio de color del indicador.

NOTA — Las variantes *Salmonella* H_2S negativas (por ejemplo *S. Paratyphi A*) que crecen en agar XLD son rosasadas con un centro rosa más oscuro. Las *Salmonella* lactosa positivas que crecen en agar XLD son amarillas con o sin ennegrecimiento.

El segundo medio sólido selectivo se incuba a la temperatura adecuada y se examina después del tiempo apropiado para comprobar la presencia de colonias que, por sus características, se consideran *Salmonella* presuntivas.

9.5 Confirmación.

9.5.1 General

Pueden utilizarse los sistemas de identificación que están disponibles en el comercio para el examen bioquímico de *Salmonella* si demuestran ser fiables. El empleo de los kits de identificación se refiere a la confirmación bioquímica de las colonias. Es conveniente que estos kits se empleen siguiendo las instrucciones del fabricante.

NOTA — El reconocimiento de las colonias de *Salmonella* es en gran parte una cuestión de experiencia y, su aspecto puede variar algo, no sólo de serovariedad a serovariedad, sino también de lote a lote del medio de cultivo selectivo utilizado.

9.5.2 Selección de colonias para confirmación.

Para confirmación se toma al menos una colonia considerada como típica o sospechosa de cada placa (dos placas de tamaño pequeño o una placa de tamaño grande) de cada medio selectivo (véase el apartado 9.4) y, luego, otras cuatro colonias si la primera es negativa. Se recomienda que se identifiquen al menos cinco colonias en el caso de estudios epidemiológicos. Si en una placa hubiera menos de cinco colonias típicas o sospechosas, se toman para confirmación todas las colonias típicas o sospechosas.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

Se siembran las colonias seleccionadas en la superficie de placas de agar nutritivo previamente secado (5.2.5), de manera que permita el desarrollo de colonias bien aisladas. Se incuban las placas sembradas (9.4.3) a 37 °C ± 1 °C durante 24 h 3h. Usar colonias puras para la confirmación bioquímica y serológica.

9.5.3 Confirmación Bioquímica

9.5.3.1 General

Por medio de un asa de inoculación, inocular los medios especificados desde 9.5.3.2 a 9.5.3.7 con cada uno de los cultivos obtenidos de las colonias seleccionadas en 9.5.2.

9.5.3.2 Agar TSI (5.2.6)

- Estriar en la superficie inclinada del agar y por puntura en profundidad
- Incubar a 37 °C por 24h
- Interpretar los cambios en el medio como sigue:

a) Profundidad

Amarillo: glucosa positiva (fermentación de la glucosa)

Rojo o sin cambio: glucosa negativa (no fermentación de la glucosa)

Negro: formación de sulfuro de hidrogeno.

Burbujas o grietas: formación de gas de la glucosa.

b) Superficie Inclinada

Amarillo: lactosa y/o sucrosa positiva (lactosa y/o sucrosa usada)

Rojo o sin cambio de color: lactosa y sucrosa negativas (no uso de lactosa ni sucrosa)

Los cultivos típicos de *Salmonella* muestran la superficie inclinada alcalina (rojo), en profundidad con formación de gas y acidez (amarillo) con formación de sulfuro de hidrogeno oscureciendo el agar (alrededor del 90% de los casos)

Cuando son aisladas *Salmonellas* lactosa positivas (ver 4.4) la superficie inclinada del TSI es amarilla. En consecuencia las confirmaciones preliminares para estos cultivos de *Salmonella* no deben estar basados solamente en los resultados de la prueba del TSI (ver 9.5.3)

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

9.5.3.3 Agar Urea (5.2.7)

- Estriar en la superficie del agar
- Incubar a 37 °C por 24h y examinar en intervalos

Si la reacción es positiva, la degradación de la urea libera amoníaco, con cambio de color de rojo fenol a rosa rosado y luego cereza profundo. La reacción aparece regularmente de 2 a 4 h.

9.5.3.4 Medio Descarboxilación L-Lisina (5.2.8)

- Inocule debajo de la superficie del medio líquido.
- Incubar a 37 °C ± 1°C por 24 h ± 3h.

Turbidez y un color púrpura después de la incubación indica una reacción positiva. Un color amarillo indica una reacción negativa.

9.5.3.5 Detección de la β-galactosidasa (5.2.9)

- Se suspende una asada en un tubo conteniendo 0,25 mL de solución salina (5.2.13).
- Agregue una gota de tolueno y agite el tubo.
- Coloque el tubo en un baño de agua (6.6) a 37 °C y déjelo por algunos minutos (aproximadamente 5 minutos)
- Agregue 0.25 mL de reactivo para detección de la β-galactosidasa y mezcle.
- Vuelva a poner el tubo en el baño de agua a 37 °C, dejarlo por 24 h ± 3h examinando el tubo a intervalos.

Un color amarillo indica una reacción positiva. La reacción aparece usualmente después de los 20 min. Si discos de papel son usados (5.2.9) siga las instrucciones del fabricante.

9.5.3.6 Medio para la reacción de Voges-Proskauer (VP) (5.2.10)

- Se suspenda una asada de una colonia sospechosa en un tubo estéril conteniendo 3 ml de medio VP
- Incubar a 37 °C ± 1°C por 24 h ± 3 h.
- Después de la incubación agregue dos gotas de solución de creatina (5.2.10.2), tres gotas de la solución etanólica de 1-naftol (5.2.10.3) y luego dos gotas de solución de hidróxido de potasio (5.2.10.4); Agite después de la adición de cada reactivo.

La formación de un rosado a un rojo claro dentro de los 15 minutos indica una reacción positiva.

9.5.3.7 Medio para la reacción de indol. (5.2.11)

- Inocule una asada a un tubo que contiene 5 mL del medio triptona/triptofano.
- Incube a 37 °C ± 1°C por 24 h ± 3 h.
- Después de la incubación agregue 1 mL de reactivo de kovacs (5.2.11.2)

La formación de un anillo rojo indica una reacción positiva. Un aro amarillo-marrón indica una reacción negativa.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

9.5.4 Interpretación de las pruebas bioquímicas

Salmonella muestra generalmente las reacciones que se dan en la tabla 1.

9.5.4.1 Confirmación Serológica

La detección de la presencia de Salmonera antígenos O, Vi y H es probado por aglutinación en lamina con el suero apropiado, provenientes de colonias puras (9.5.1) y después que hayan sido eliminados las cepas auto-aglutinables.

9.5.4.2 Eliminación de cepas auto-aglutinables

Colocar una gota de solución salina (5.2.13) cuidadosamente en una lamina de vidrio limpia. Dispersar en esta gota parte de una colonia a ser examinada, con un asa (6.7) para obtener una suspensión turbia y homogénea. Mueva la lámina suavemente de 30 a 60 s. Observe el resultado contra un fondo oscuro, preferiblemente con la ayuda de una lupa. Si la bacteria están agrupadas en mas o menos unidades distintas, la cepa es considerada auto-aglutinable, y no serán permitidas para las siguientes pruebas.

1

Interpretación de las pruebas bioquímicas

Tabla N°

Prueba a (9.5.3.2 a 9.5.3.7)	Cepa de <i>Salmonella</i>									
	<i>S. typhi</i>		<i>S. paratyphi A</i>		<i>S. paratyphi B</i>		<i>S. paratyphi C</i>		Otras cepas	% ^b
	Reacción	% ^b	Reacción	% ^b	Reacción	% ^c	Reacción	% ^c		
Ácido de glucosa en TSI	+	100	+		100		+		+	100
Gas de glucosa en TSI	— ^d	0	+		100		+		+	92
Ácido de lactosa en TSI	—	2	—		100		—		—	1
Ácido de sacarosa en TSI	—	0	—		0		—		—	1
Producción de sulfuro de hidrógeno en TSI	+	97	—		10		+		+	92
Hidrólisis de urea	—	0	—		0		—		—	1
Descarboxilación de la lisina	+	98	—		0		+		+	95
Reacción de P-galactosidasa	—	0	—		0		—		—	2 ^e

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

Reacción de Voges-Proskauer	—	0	—	0	—	—	0
Producción de indol	—	0	—	0	—	—	1

- A De la referencia [5].
- b Estos porcentajes indican que no todos los aislamientos de serotipos de *Salmonella* dan las reacciones marcadas como + ó -. Estos porcentajes pueden variar dentro de un mismo serotipo y entre un serotipo y otro de los causantes de toxi-infecciones alimentarias de diferentes procedencias.
- c Los porcentajes no son conocidos según la literatura disponible.
- d *Salmonella typhi* no produce gas.
- e Las *Salmonella enterica* subespecie *arizonae* dan una reacción de lactosa positiva o negativa pero son siempre 13-galactosidasa positivo. Para el estudio de estas cepas puede ser útil realizar pruebas complementarias.

9.5.4.3 Examinación de antígenos - O

Usando una colonia pura reconocida como no auto-aglutinable, proceder de acuerdo al 9.5.4.2, usando una gota del suero anti-O (5.3) en vez de la solución salina.

Si la aglutinación ocurre, la reacción es considerada positiva.

Use el suero poli- y monovalente uno después del otro.

9.5.4.4 Examinación de los antígenos Vi

Proceder de acuerdo al 9.5.4.2, pero usando una gota del suero anti.V (5.3) en vez de solución salina. Si la aglutinación ocurre, la reacción es considerada positiva.

9.5.4.5 Examinación de los antígenos H

Inocular el agar nutriente semisólido (5.2.12) con una colonia pura no auto-aglutinable.

Incubar el medio a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$.

Use este cultivo para la examinación de los antígenos H, procediendo de acuerdo a 9.5.4.2, pero utilice una gota del suero anti-H (5.3) en vez de solución salina.

Si la aglutinación ocurre, la reacción es considerada positiva.

9.5.5 Interpretación de reacciones bioquímicas y serológicas.

La Tabla 2 muestra la interpretación de los pruebas confirmatorias (9.5.3 y 9.5.4) llevado a cabo sobre las colonias utilizadas (9.5.2).

Tabla 2 Interpretación de pruebas confirmativas

Reacciones	Autoaglutinación	Reacciones	Interpretación
------------	------------------	------------	----------------

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

bioquímicas		serológicas	
Típica	No	Antígenos O, Vi o H positivo	Cepas consideradas como <i>Salmonela</i>
Típica	No	Todas las reacciones negativas	Puede ser <i>Salmonela</i>
Típica	Si	No examinados (ver 9.5.4.2)	
Reacciones no típica	No/ Si	Antígenos O, Vi o H positivo	
Reacciones no típica	No/ Si	Todas las reacciones negativas	No se considerada que sea <i>Salmonela</i>

9.5.6 Confirmación Definitiva

Cepas que son consideradas a ser *Salmonela*, o que podrían ser *Salmonela* (ver tabla 2), deben enviarse a un centro de referencia de *Salmonella* reconocido para su tipado definitivo.

10. EXPRESION DE RESULTADOS

En concordancia con los resultados de la interpretación, indique la presencia o ausencia de *Salmonela* en una porción "x" g o "x" ml del producto (ver ISO 7218).

11. REPORTE DE ENSAYO

El reporte de ensayo debe especificar lo siguiente:

- El método de toma de muestras empleado, si se conoce;
- Cualquier desviación en el medio de enriquecimiento empleado o en las condiciones de incubación;
- Todos los detalles operativos no especificados en esta Norma Internacional o considerados opcionales, junto con los detalles de todo tipo de incidencias que pudieran haber afectado a los resultados;
- Los resultados obtenidos.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

El informe del análisis debe también hacer constar si se obtuvo un resultado positivo exclusivamente con un medio en placa (5.2.4) no especificado en esta norma internacional.

12 ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

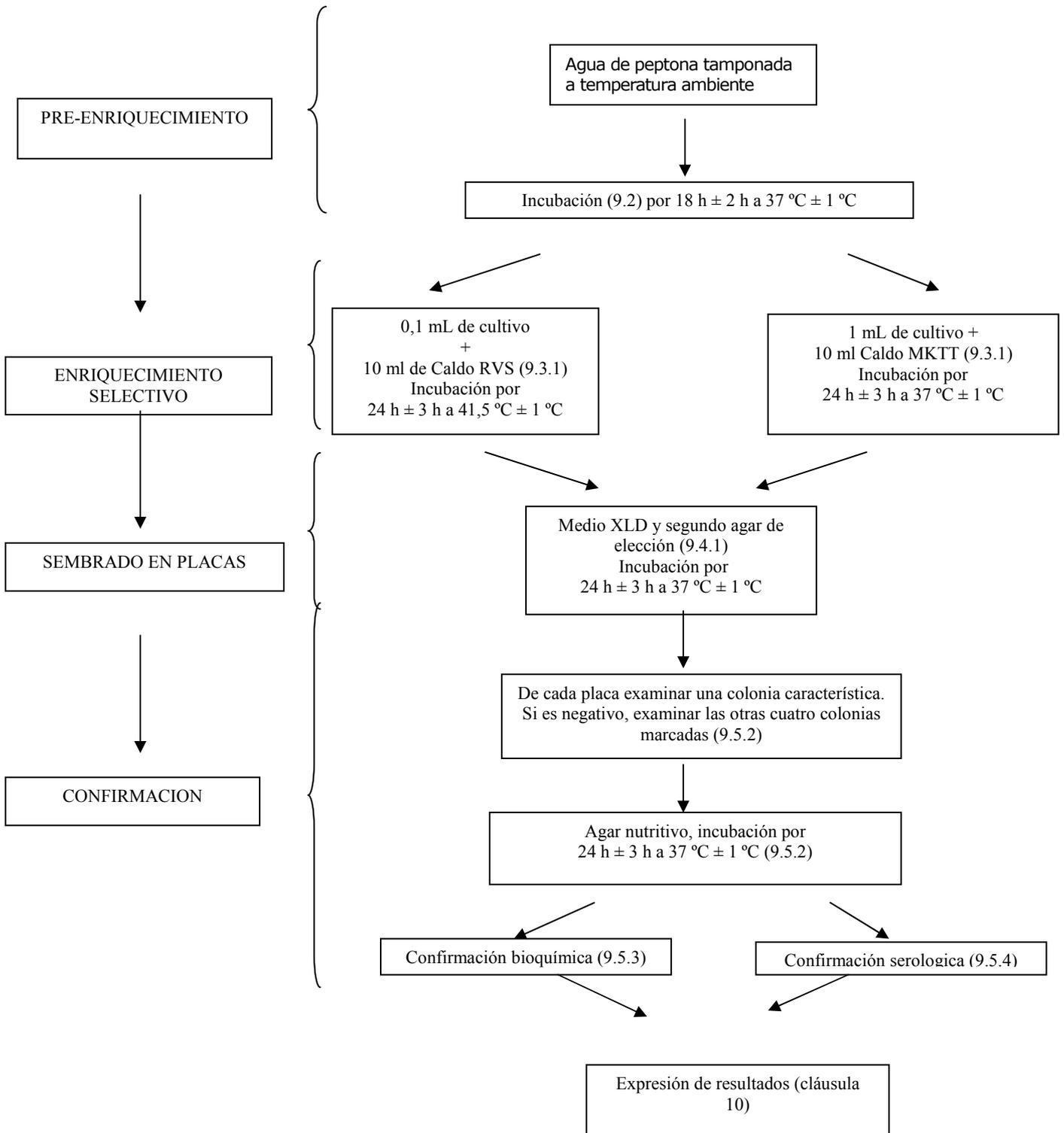
Para comprobar la capacidad del laboratorio para detectar *Salmonella* con los métodos y medios descritos en esta Norma Internacional, se introducen muestras de referencia en matraces del medio de pre enriquecimiento (véase el apartado 5.2.1). Se procede con los matraces de control de la misma manera que con los cultivos para análisis.

Reemplaza a: Manual de DIGESA
Revisión: 00
Fecha: Octubre del 2001

**MANUAL DE MÉTODOS
DE ENSAYO PARA
MARISCOS Y AGUAS
SANIPES**

Código:
Revisión: 01
Elaborado por: MAP
Revisado por: ASM
Aprobado por: MAG
Fecha: Agosto, 2009

**ANEXO A: Diagrama del procedimiento
(Normativa)**



Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

ANEXO B: Composición y preparación de los medios de cultivo y reactivos (Normativa)

B.1 Agua Peptonada Buferada

B1.1. Composición:

Peptona	10g
Cloruro de Sodio	5,0g
Hidrogeno fosfato disodio (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O)	9,0g
Hidrogeno fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄).....	1,5g
Agua	1000 mL

B.1.2. Preparación

Disolver los componentes en el agua, por calentamiento si es necesario. Ajuste el pH, si es necesario, para que después de la esterilización sea de 7,0 ± 0,2 a 25°C.

Dispense el medio en matraces de capacidad conveniente para la obtención de porciones necesarias para la prueba.

Esterilizar en autoclave (6.1) por 15 minutos a 121°C

B.2 Medio de Rappaport-Vassiliadis con soya (caldo RVS)

B.2.1 Disolución A

B.2.1.1 Composición

Digerido enzimático de soya	5,0 g
Cloruro de Sodio	8,0g
Fosfato de potasio dihidrogeno (KH ₂ PO ₄).....	1,4g
Fosfato hidrogeno dipotasico (K ₂ HPO ₄)	0,2g
Agua.....	1000 mL

B. 2.1.2 Preparación

Disolver los componentes en agua por calentamiento a 70°C si es necesario. La solución debe de ser preparado en el mismo día de preparación del medio completo RVS.

B.2.2. Solución B

B.2.1. Composición

Cloruro de Magnesio hexahidratado (MgCl ₂ .6H ₂ O).....	400,0g
Agua	1000 mL

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

B.2.2.2 Preparación.

Se disuelve el cloruro magnésico en el agua.

Como esta sal es muy higroscópica, se aconseja disolver el contenido entero de un recipiente recién abierto de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ siguiendo la formulación. Por ejemplo, 250 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ se añaden a 625 ml de agua, dando una disolución con un volumen total de 788 ml y una concentración en peso de unos 31,7 g por 100 ml de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$. La disolución puede mantenerse en frascos de vidrio de color topacio bien cerrados y a temperatura ambiente durante 2 años como mínimo.

B.2.3. Solucion C

B2.3.1 Composicion

Oxalato verde de Malaquita.....0,4g
 Agua..... 100 mL

B.2.3.2 Preparación.

Se disuelve el oxalato verde de malaquita en el agua.

La disolución puede mantenerse en frascos de vidrio de color marrón a temperatura ambiente durante 8 meses como mínimo.

B.2.4 Medio Completo

B.2.4.1 Composicion

Solucion A (B.2.1).....1000 mL
 Solucion B (B.2.2) 100 mL
 Solucion C (B.2.3).....10 mL

B.2.4.2 Preparación.

Se añaden a 1 000 ml de la disolución A, 100 ml de la disolución B y 10 ml de la disolución C.

Se ajusta el pH, si fuera necesario, de manera que después de la esterilización sea de $5,2 \pm 0,2$.

Antes de su uso se reparte en tubos de ensayo (6.9) en cantidades de 10 ml.

Se esteriliza durante 15 minutos en el autoclave (6.1) ajustado a 115 °C.

Se almacena el medio preparado a $3 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$. El medio ha de utilizarse el día de su preparación.

NOTA — La composición final del medio es: digerido enzimático de soja, 4,5 g/l; cloruro sódico, 7,2 g/l; dihidrógeno fosfato de potasio ($KH_2PO_4 + K_2HPO_4$), 1,44 g/l; cloruro magnésico anhidro ($MgCl_2$), 13,4 g/l o cloruro magnésico hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), 28,6 g/l; oxalato verde de malaquita, 0,036 g/l.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

B.3. Caldo Muller-Kauffmann Tetrionato/ Novobiocina (MKTTn)

B.3.1 Medio Base

B.3.1.1 Composición

Extracto de Carne.....	4,3g
Digerido enzimático de Caseína	8,6g
Cloruro de sodio (NaCl).....	2,6g
Carbonato de Calcio (CaCO ₃).....	38,7g
Tiosulfato de sodio pentahidratado (Na ₂ S ₂ O ₃ . 5H ₂ O).....	47,8g
Bilis de Buey para uso microbiológico	4,78g
Verde brillante	9,6 mg
Agua.....	1000 mL

B.3.1.2 Preparación.

Se disuelven los componentes básicos deshidratados o el medio completo deshidratado en el agua mediante ebullición durante 5 min. Se ajusta el pH, si fuera necesario, de manera que sea de $8,0 \pm 0,2$ a 25 °C.

Se mezcla el medio completamente. El medio base puede ser almacenado durante 4 semanas a $3 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$.

B.3.2. Solucion de yodo-yoduro

B.3.2.1 Composición

Yodo	20,0g
Yoduro de Potasio (KI).....	25,0g
Agua.....	100 mL

B.3.2.2 Preparación

Disolver completamente el Yoduro de Potasio en 10 ml de agua, y luego agregar el yodo y diluir hasta 100 ml con agua estéril. No calentar.

Conservar la solución en la oscuridad a temperatura ambiente en un recipiente herméticamente cerrado.

B.3.3 Solución de Novobiocina

B. 3.3.1 Composición

Sal Sodica de Novobiocina.....	0,04g
Agua.....	5mL

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

B.3.3.2 Preparación

Disolver la sal sodica de Novobiocina en agua y esterilizar por filtración.
Conservar hasta por 4 semanas a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

B.3.4. Medio Completo

B.3.4.1 Composición

Medio Base (B.3.1).....	1000 mL
Solución Yodo-Yoduro (B.3.2)	20 mL
Solución de Novobiocina (B.3.3).....	5 mL

B.3.4.2. Preparación

Agregar asépticamente 5 ml de solución de novobiocina (B.3.3) a 1000 ml de medio base (B.3.1). Mezclar y luego agregar 20 ml de la solución de yodo-yoduro (B.3.2). Mezclar bien. Dispensar el medio asépticamente en matraces estériles de capacidad suficientes para obtener porciones necesarias para el ensayo. El medio completo debe de ser usado el mismo día de su preparación.

B.4 Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (Agar XLD)

B.4.1 Medio Base

B.4.1.1 Composición

Extracto de levadura en polvo.....	3,0g
Cloruro de Sodio (NaCl).....	5,0g
Xilosa.....	3,75g
Lactosa.....	7,5g
Sucrosa.....	7,5g
L-Lisina Hidrocloruro	5,0g
Tiosulfato de Sodio	6,8g
Citrato Amónico de Hierro (III).....	0,8g
Rojo de Fenol	0,08g
Sodio desoxicolato.....	1,0g
Agar	9g a 18g ¹
Agua.....	1000 mL

¹⁾ Dependiendo de la fuerza de gelificación del agar.

B.4.1.2 Preparación

Disolver los componentes básicos deshidratados o el medio base completo deshidratado en agua mediante calentamiento, con agitación frecuente hasta que comience a hervir. Evitar el sobrecalentamiento. Ajustar el pH si es necesario, para que después de la esterilizaciones te sea de $7,4 \pm 0,2$ a 25°C .

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

Se vierte en tubos o matraces de adecuada capacidad. Calentar con agitación frecuente hasta que el medio hierva y se disuelva el agar. No sobrecalentar.

B.4.2 Preparación de las placas de Agar

Transferir inmediatamente a un baño de agua (6.5) de 44°C a 47°C, agitar y verter en las placas. Dejar que solidifique. Inmediatamente antes de su uso, secar las placas de agar con cuidado (preferiblemente sin las tapas y con la superficie del agar hacia abajo) en la estufa (6.2) regulado entre 37°C y 55°C hasta que la superficie del agar este seca. Conservar las placas hasta 5 días a 3°C ± 2°C.

B.5. Agar Nutritivo

B.5.1. Composición

Extracto de carne.....	3,0g
Peptona.....	5,0g
Agar.....	9g a 18 g ¹
Agua.....	1000 mL

B.5.2. Preparación

Disolver los componentes del medio en agua, por calentamiento si es necesario. Ajustar el pH si es necesario, después de la esterilización debe de ser 7,0. Transferir el medio de cultivo dentro de tubos o botellas de adecuada capacidad. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

B.5.3. Preparación de agar nutritivo en placas.

Transferir alrededor de 15 mL del medio estéril en placas petri pequeñas (6.11) y proceda como en B.4.2.

B.6. Agar Triple azúcar/hierro (Agar TSI)

B.6.1. Composición

Extracto de carne.....	3,0g
Extracto de levadura.....	3,0g
Peptona.....	20,0g
Cloruro de sodio.....	5,0g
Lactosa.....	10,0g
Sucrosa.....	10,0g
Glucosa.....	1,0g
Citrato de Hierro III.....	0,3g
Tiosulfato de sodio.....	0,3g
Rojo de fenol.....	0,024g

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

Agar 9 a 18g
Agua 1000 mL

B.6.2. Preparación

Disolver los componentes del medio en agua, por calentamiento si es necesario. Ajustar el pH si es necesario para q después de la esterilización sea de $7,4 \pm 0,2$ a 25°C . Dispense en cantidades de 10 mL en tubos. Esterilizar en autoclave (6.1) a 121°C por 15 minutos. Permitir colocar en una posición inclinada dando al extremo una profundidad de 2,5 cm a 5 cm.

B.7. Agar Urea (Christensen)

B.7.1. Base

B.7.1.1. Composición

Peptona 1,0g
Glucosa 1,0g
Cloruro de sodio 5,0g
Fosfato de potasio dihidrogeno (KH_2PO_4) 2,0g
Rojo de fenol 0,012g
Agua 1000 mL

B.7.1.2. Preparación

Disolver los componentes del medio en agua, por calentamiento si es necesario. Ajustar el pH si es necesario para q después de la esterilización sea de $6,8 \pm 0,2$ a 25°C . Esterilizar en autoclave (6.1) a 121°C por 15 minutos.

B.7.2. Solución de Urea

B.7.2.1. Composición

Urea 400g
Agua, para tener un volumen final de 1000 mL

B.7.2.2. Preparación

Disolver la urea en el agua. Esterilizar por filtración y comprobar la esterilidad. Ver ISO 7218: 1996, 7.3.2

B.7.3. Medio Completo

B.7.3.1. Composición

Base (B.7.1) 950 mL
Solución de Urea (B.7.2) 50 mL

B. 7.3.2. Preparación

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

Agregar en condiciones asépticas, la solución de urea a la base y luego enfriar de 44°C a 47°C. Dispensar el medio en cantidades de 10 mL en tubos estériles(6.9). Dejar en posición inclinada.

B.8 Medio L-Lisina descarboxilasa

B.8.1 Composición

L-lisina monohidroclorada	5,0g
Extracto de levadura	3,0g
Glucosa	1,0g
Purpura de Bromocresol	0,015g
Agua	1000 mL

B.8.2 Preparación

Disolver los componentes en el agua, por calentamiento si es necesario.

Ajustar el pH, si es necesario, de tal modo que después de la esterilización este sea 6.8 ± 0,2 a 25°C.

Transferir el medio en cantidades de 2ml a 5 mL a tubos de cultivo pequeños (6.9) con tapa rosca. Esterilizar en el autoclave (6.1) a 121°C por 15 min.

B.9 Reactivo de β-Galactosidasa

B.9.1 Solución de buffer

B.9.1.1 Composición

Dihidrógeno fosfato de sodio (NaH ₂ PO ₄)	6,9 g
Hidróxido de sodio, solución de 10 mol/l.....	alrededor de 3mL
Agua, para un volumen final de.....	50 mL

B.9.1.2 Preparación

Disolver el dihidrógeno fosfato de sodio en aproximadamente 45 mL de agua en un frasco volumétrico. Ajustar el pH a 7,0 con la solución de hidróxido de sodio.

Adicionar el agua a un volumen final de 50 mL.

B.9.2 Solución de ONPG

B.9.2.1 Composición

o-Nitrofenil β-D-galactopiranosido (ONPG)	0,08 g
Agua.....	15 mL

B.9.2.2 Preparación

Disolver el ONPG en agua aproximadamente a 50°C. Enfriar la solución.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

B.9.2.3 Reactivos completos

B.9.3.1 Composición

Solución de Buffer (B.9.1)	5 mL
Solución ONPG (B.9.2)	15 mL

B.9.3.2 Preparación

Adicionar la solución de buffer a la solución de ONPG.

B.10 Reactivos para la reacción de Voges-Proskauer (VP)

B.10.1 Medio VP

B.10.1.1 Composición

Peptona	7,0 g
Glucosa.....	5,0 g
Hidrógeno fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄).....	5,0 g
Agua.....	1000mL

B.10.1.2 Preparación

Disolver los componentes en el agua, por calentamiento si es necesario.

Ajustar el pH, si es necesario, de tal manera que después de la esterilización este sea 6.9± 0,2 a 25°C. Transferir 3 mL del medio dentro de cada uno de los varios tubos (6.9)

Esterilizar en el autoclave (6.1) a 121 °C por 15 min.

B.10.2 Solucion de Creatina (N- amidinosarcosine)

B.10.2.1 Composición

Creatina monohidratada	0,5 g
Agua.....	100mL

B.10.2.2 Preparación

Disolver la creatina monohidratada en el agua.

B.10.3. 1 -Naftol, solución etanolica

B.10.3.1 Composición

1-Naftol.....	6 g
Etanol, 96 % (fraccion volumen)	100 mL

B.10.3.2 Preparación

Disolver el 1-naftol en el etanol.

B.10.4 Solución de Hidróxido de potasio

B.10.4.1 Composición

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

Hidróxido de potasio40 g
Agua..... 100 mL

B.10.4.2 Preparación

Disolver el hidróxido de potasio en el agua.

B.11 Reactivos para la reacción de Indol

B.11.1 Medio Triptona/triptofano.

B.11.1.1 Composición

Triptona..... 10 g
Cloruro de sodio (NaCl)..... 5 g
DL-Triptofano1 g
Agua.....1000 mL

B.11.1.2 Preparación

Disolver los componentes en el agua hasta que hierva.

Ajustar el pH, si es necesario, de tal manera que después de la esterilización este sea $7,5 \pm 0,2$ a 25°C .

Dispensar 5 mL del medio dentro de cada uno de varios tubos(6.9)

Esterilizar en el autoclave (6.1) a 121°C por 15 min.

B.11.2 Reactivo de Kovacs

B.11.2.1 Composición

4-Dimetilaminobenzaldehido 5 g
Acido Hidroclorico, $\rho = 1,18 \text{ g/mL}$ a $1,19 \text{ g/mL}$ 25 mL
2-Metilbutano-2-ol 75 mL

B.11.2.2 Preparación

Mezclar los componentes.

B.12 Agar nutritivo semisólido

B.12.1 Composición

Extracto de carne.....3,0 g
Peptona5,0 g
Agar4g a 9g¹⁾

B.12.2 Preparación

Disolver los componentes en el agua, por calentamiento si es necesario.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

Ajustar el pH, de tal manera que después de la esterilización este sea $7,0 \pm 0,2$ a 25°C .
Transferir el medio a frascos de capacidad apropiada.
Esterilizar a 121°C por 15 min.

B.12.3 Preparación de placas de agar

Colocar en placas de petri pequeñas (6.11) alrededor de 15 mL del medio preparado fresco. No dejar que las placas se sequen.

B.13 Solución salina

B.13.1 Composición

Cloruro de sodio8,5 g

Agua..... 1000 mL

B.13.2 Preparación

Disolver el cloruro de sodio en el agua, por calentamiento si es necesario.

Ajustar el pH, si es necesario, de tal manera que después de la esterilización este sea $7,0 \pm 0,2$ a 25°C .

Dispensar cantidades de la solución dentro de frascos o tubos de tal manera que ellos contendrían 90 mL o 100 mL depuse de la esterilización.

Esterilizar en el autoclave (6.1) a 121°C por 15 min.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

SECCIÓN VII. DETECCIÓN DE SALMONELLA EN ALIMENTOS

**Bacteriological Analytical Manual on line.
De abril de 2003; Actualizado septiembre de 2005**

ENSAYO : *Salmonella spp*
 PRODUCTO : Moluscos bivalvos, gasterópodos y tunicados
 REFERENCIA: Bacteriological Analytical Manual on line.
 De abril de 2003; Actualizado septiembre de 2005, de diciembre de 2005, de junio de 2006, y diciembre de 2007.

INTRODUCCIÓN:

Varios cambios se están introduciendo en esta edición del BAM (8a edición). El primer cambio consiste en la ampliación del uso del medio Rappaport - Vassiliadis (RV) para los alimentos con alto y bajo nivel de microflora competitiva. En la edición anterior se recomendó el medio RV solo para el análisis de camarón. Basado en el cumplimiento de estudios precolaborativos y colaborativos de la AOAC, el medio RV se recomienda ahora para análisis de carga microbiana alta y baja en alimentos. El medio RV sustituye al caldo Selenito Cistina (SC) para el análisis de todos los alimentos, excepto en la goma guar. Además el medio RV sustituye el caldo lauril sulfato triptosa para su uso con levadura seca activa. El caldo Tetratoato (TT) sigue siendo utilizado como el segundo caldo selectivo de enriquecimiento. Sin embargo, el caldo TT se debe incubar a 43°C para alimentos de alta carga microbiana y a 35°C para alimentos de baja carga microbiana, incluyendo goma guar.

El segundo cambio consiste en la opción de pre enriquecimiento incubados en refrigeración y enriquecimiento selectivo de alimentos de baja humedad hasta por 72 horas. Con esta opción, los análisis de las muestras pueden iniciarse hasta un miércoles o jueves sin que este involucrado trabajar el fin de semana.

El tercer cambio consiste en reducir el periodo de incubación del Agar Lisina hierro (LIA) en plano inclinado. En la antigua edición (BAM - 7) el Agar Triple azúcar hierro (TSI) y LIA fueron incubados a 35°C por 24 ± 2 h y 48 ± 2 h, respectivamente. Datos no publicados han demostrado que la lectura de las 48 h en LIA es sin valor diagnóstico. De los 193 LIA en plano inclinado examinados, todos dieron resultados definitivos dentro de las 24 ± 2 h de incubación. No hay cambios significativos que alteren la prueba final cuando son incubados 24 h adicionales. Así, tanto el TSI y LIA en plano inclinado ahora son incubados por 24 ± 2 h.

Las instrucciones para picar las colonias de agares selectivos se han hecho mas explicitas para reflejar la intención del método. En ausencia de de colonias típicas o

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

sospechosas en los agares selectivos, se recomienda que las colonias atípicas sean picadas del TSI y LIA en plano inclinado. Esta recomendación esta basada en el hecho que más del 4% de todos los cultivos de Salmonella aisladas por analistas del FDA de ciertos alimentos, especialmente pescados y mariscos, durante los últimos años han sido atípicos.

Finalmente, desde la publicación del BAM - 7, una manera 6 de comparación de comportamiento de la efectividad de los tres agares selectivos recomendados por el BAM (Agar Sulfito bismuto, Agar Hektoen entericos y Agar Xilosa lysina desoxycolato) y tres agares relativamente nuevos (Agar EF - 18, Agar Xylosa lisina tergitol 4 y Agar Rambach). Nuestros resultados (9) indicaron que no existe una ventaja en reemplazar ninguno de los agares recomendados por el BAM con uno o más de los nuevos agares. Así, la combinación de los agares selectivos recomendados en BAM - 7 no ha cambiado.

1. EQUIPOS Y MATERIALES

- Licuadora y batidora jarras estériles (ver preparación de muestras)
- Botellas Estériles de 16 oz (500 mL) de boca ancha tapa rosca, frascos Erlenmeyer estériles de 500 mL, vasos de vidrio de 250 mL, embudos de vidrio o papel estéril de tamaño adecuado y, opcionalmente, contenedores de una capacidad apropiada para el composito de las muestras.
- Sterile, bent glass or plastic spreader rods Espátulas curvadas estériles de vidrio o plástico.
- Balance, with weights; 2000 g capacity, sensitivity of 0.1 g Balanza, con los pesos, de 2000 g de capacidad, la sensibilidad de 0,1 g
- Balance, with weights; 120 g capacity, sensitivity of 5 mg Balanza, con pesos; 120 g de capacidad, la sensibilidad de 5 mg
- Incubator, $35 \pm 2^\circ\text{C}$ Incubadora, $35 \pm 2^\circ\text{C}$
- Refrigerated incubator or laboratory refrigerator, $4 \pm 2^\circ\text{C}$ Incubadora refrigerada o refrigerador de laboratorio, $4 \pm 2^\circ\text{C}$
- Water bath, $49 \pm 1^\circ\text{C}$ Baño de agua, $49 \pm 1^\circ\text{C}$
- Water bath, circulating, thermostatically-controlled, $43 \pm 0.2^\circ\text{C}$ Baño de agua, que circula, controlada por termostato, $43 \pm 0,2^\circ\text{C}$
- Water bath, circulating, thermostatically-controlled, $42 \pm 0.2^\circ\text{C}$ Baño de agua, que circula, controlada por termostato, $42 \pm 0,2^\circ\text{C}$
- Sterile spoons or other appropriate instruments for transferring food samples Cucharas estériles u otros instrumentos adecuados para el traslado de muestras de alimentos
- Sterile culture dishes, 15 x 100 mm, glass or plastic Placas Petri esteriles , 15 x 100 mm, de vidrio o plástico

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

- Sterile pipets, 1 ml, with 0.01 ml graduations; 5 and 10 ml, with 0.1 ml graduations
Pipetas estériles de 1 mL, con 0,01 mL de graduaciones; 5 y 10 mL con 0,1 mL de graduaciones
- Inoculating needle and inoculating loop (about 3 mm id or 10 5l), nichrome, platinum-iridium, chromel wire, or sterile plastic Asas de siembra en aguja y en aro (alrededor de 3 mm) de nicrom, platino-iridio, alambre de cromo o plástico estéril
- Sterile test or culture tubes, 16 x 150 mm and 20 x 150 mm; serological tubes, 10 x 75 mm or 13 x 100 mm Tubos de ensayo estériles, de 16 x 150 mm y de 20 x 150 mm; tubos serológicos de 10 x 75 mm o 13 x 100 mm
- Test or culture tube racks Porta tubos de ensayo
- Vortex mixer Mezclador Vortex
- Sterile shears, large scissors, scalpel, and forceps Tijeras estériles, tijeras largas, bisturí, y pinzas
- Lamp (for observing serological reactions) Lámpara (para la observación de las reacciones serológicas)
- Fisher or Bunsen burner Mechero Fisher o Bunsen
- pH test paper (pH range 6-8) with maximum graduations of 0.4 pH units per color change Cinta de prueba de pH (pH 6-8) con graduaciones máximas de 0,4 unidades de pH por cambio de color
- pH meter PH-metro
- Plastic bags, 28 x 37 cm, sterile, with resealable tape. Bolsas de plástico, 28 x 37 cm, estéril, con cinta resellable. (Items 23-24 are needed in the analysis of frog legs and rabbit carcasses.)
- Plastic beakers, 4 liter, autoclavable, for holding plastic bag during shaking and incubation. Vasos de plástico, 4 litros, autoclavable, que puedan contener la bolsa de plástico durante el movimiento y la incubación.

2. MEDIOS Y REACTIVOS

Para la preparación de medios y reactivos, se refieren a los Métodos 967.25 - 967.28 en el Métodos Oficial de Análisis (1).

- Caldo lactosado (M74)
- Nonfat dry milk (reconstituted) (M111) Leche sin grasa (reconstituido) (M111)
- Selenite cystine (SC) broth (M134) Caldo Selenito cistina (SC) (M134)
- Tetrathionate (TT) broth (M145) Caldo Tetrationato (TT) (M145)
- Rappaport-Vassiliadis (RV) medium (M132). Medio Rappaport-Vassiliadis (RV) (M132). NOTE: RV medium must be made from its individual ingredients. NOTA: El medio RV debe hacerse por cada uno de sus ingredientes. Commercial formulations are not acceptable. Formulaciones comerciales no son aceptables.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

- Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar (M179) Agar Xilosa lisina desoxycoolato (XLD) (M179)
- Hektoen enteric (HE) agar (M61) Agar Hektoen entérico (HE) (M61)
- Bismuth sulfite (BS) agar (M19) Agar Bismuto sulfito (BS) (M19)
- Triple sugar iron agar (TSI) (M149) Agar Triple azúcar hierro (TSI) (M149)
- Tryptone (tryptophane) broth (M164) Caldo Triptona (triptofano) (M164)
- Trypticase (tryptic) soy broth (M154) Caldo Trypticase soya (tríptica) (M154)
- Trypticase soy broth with ferrous sulfate (M186) Caldo Trypticase soya con sulfato ferroso (M186)
- Trypticase soy-tryptose broth (M160) Caldo Trypticase de soya- triptosa (M160)
- MR-VP broth (M104) Caldo MR-VP (M104)
- Simmons citrate agar (M138) Agar Citrato de Simmons (M138)
- Urea broth (M171) Caldo de urea (M171)
- Urea broth (rapid) (M172) Caldo de urea (rápida) (M172)
- Malonate broth (M92) Caldo Malonato (M92)
- Lysine iron agar (LIA) (Edwards and Fife) (M89) Agar Lisina hierro (LIA) (Edwards y Fife) (M89)
- Lysine decarboxylase broth (M87) Caldo Lisina descarboxilasa (M87)
- Motility test medium (semisolid) (M103) Prueba Medio Motilidad (semisólido) (M103)
- Potassium cyanide (KCN) broth (M126) Caldo Cianuro de potasio (KCN) (M126)
- Phenol red carbohydrate broth (M121) Caldo Carbohidratos rojo fenol (M121)
- Purple carbohydrate broth (M130) Caldo Púrpura carbohidratos (M130)
- MacConkey agar (M91) Agar MacConkey (M91)
- Nutrient broth (M114) Caldo Nutritivo (M114)
- Brain heart infusion (BHI) broth (M24) Caldo Infusión cerebro corazón (BHI) (M24)
- Papain solution, 5% (M56a) Solucion de Papaína 5% (M56a)
- Cellulase solution, 1% (M187) Solucion de Celulasa 1% (M187)
- Tryptose blood agar base (M166) Agar Base sangre Triptosa (M166)
- Universal preenrichment broth (M188) Caldo Universal de pre enriquecimiento (M188)
- Universal preenrichment broth (without ferric ammonium citrate) (M188a) Caldo Universal de pre enriquecimiento(sin citrato férrico amoniaco) (M188a)
- Buffered peptone water (M192) Agua de peptona tamponada (M192)
- Dey-Engley broth (M193) Caldo Dey-Engley (M193)
- Potassium sulfite powder, anhydrous Sulfito de potasio en polvo, anhidro
- Chlorine solution, 200 ppm, containing 0.1% sodium dodecyl sulfate (R12a) Solución de cloro, 200 ppm, que contiene 0,1% dodecil sulfato de sodio (R12a)
- Ethanol, 70% (R23) Etanol, 70% (R23)

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

- Kovacs' reagent (R38) Reactivo de Kovacs' (R38)
- Voges-Proskauer (VP) test reagents (R89) Reactivos de prueba Voges Proskauer (VP) (R89)
- Creatine phosphate crystals Cristales de fosfato de creatina
- Potassium hydroxide solution, 40% (R65) Solución de hidróxido de potasio al 40% (R65)
- 1 N Sodium hydroxide solution (R73) Solución de hidróxido de sodio 1 N (R73)
- 1 N Hydrochloric acid (R36) Ácido clorhídrico 1 N (R36)
- Brilliant green dye solution, 1% (R8) Solución de Verde brillante al 1% (R8)
- Bromocresol purple dye solution, 0.2% (R9) Solución de Púrpura de Bromocresol al 0,2% (R9)
- Methyl red indicator (R44) Indicador de rojo de metilo (R44)
- Sterile distilled water Agua destilada estéril
- Tergitol Anionic 7 (R78) Tergitol aniónicos 7 (R78)
- Triton X-100 (R86) Triton X-100 (R86)
- Physiological saline solution, 0.85% (sterile) (R63) Suero fisiológico al 0,85% (estéril) (R63)
- Formalinized physiological saline solution (R27) Solucion salina fisiologica formalizado (R27)
- Salmonella polyvalent somatic (O) antiserum Antisuero Salmonella polivalentes somáticos (O)
- Salmonella polyvalent flagellar (H) antiserum Antisuero Salmonella polivalente flagelar (H)
- Salmonella somatic group (O) antisera: A, B, C 1, C 2, C 3, D 1, D 2, E 1, E 2, E 3, E 4, F, G, H, I, Vi, and other groups, as appropriate Antisuero Salmonella grupo somáticos (O): A, B, C 1, C 2, C 3, D 1, D 2, E 1, E 2, E 3, E 4, F, G, H, I, Vi, y Otros grupos, según corresponda
- Salmonella Spicer-Edwards flagellar (H) antisera Antisuero Salmonella Spicer-Edwards flagelar (H)

3. PROCEDIMIENTO

Preparación de los alimentos para el aislamiento de *Salmonella*

Los siguientes métodos se basan en el análisis de 25 g de una unidad de análisis en una proporción de 1: 9 muestra / caldo. Dependiendo de la magnitud de la composición, añadir el caldo suficiente para mantener esta proporción de 1:9 a menos que se indique otra cosa.

Los crustáceos (camarones, cangrejo, cangrejo de río, langostinos, langosta), y pescado.

- Preferiblemente, no descongelar las muestras congeladas antes de su análisis.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

- Si muestra esta congelada deberá de ser temperada para obtener una porción analítica, descongelar tan rápido como sea posible para minimizar el incremento en número de organismos competitivos o reducir el potencial de daño de *Salmonella*.
- Descongelar por debajo de los 45 ° C durante 15 minutos en un baño de agua con agitación continua controlado por termostato, o descongelar dentro de 18 horas a 2-5 ° C.
- Asépticamente pesar 25 g de muestra en un contenedor estéril de mezcla. Añadir 225 mL de caldo lactosado estéril y licuar por 2 minutos.
- Asépticamente transferir el homogeneizado a una jarra estéril de boca ancha y tapa rosca de 500 mL o de otro de contenedor apropiado y deje reposar 60 ± 5 minutos a temperatura ambiente con la tapa bien cerrada.
- Mezclar bien por agitación y determinar el pH con la cinta de pH. Ajustar el pH, si es necesario, a 6,8 ± 0,2. Mezclar bien y afloje la tapa de la jarra cerca de 1/4 de vuelta.
- Incubar 24 ± 2 horas a 35 ° C. Continuar como en el D, 1-11, debajo.

4. El aislamiento de *Salmonella*

4.1. Apriete la tapa y agitar suavemente la muestra incubada.

Transferencia de 0,1 mL a 10 mL de la mezcla Rappaport-Vassiliadis (RV) y 1 mL de la mezcla de 10 mL de caldo tetracionato (TT) Agitar.

4.2. Incubar en medios selectivos de enriquecimiento de la siguiente manera:

Los alimentos con una alta carga microbiana. Incubar el medio RV 24 ± 2 horas a 42 ± 0,2 ° C (baño de agua circulante, controlada por termostato). Incubar caldo TT de 24 ± 2 horas a 43 ± 0,2 ° C (baño de agua circulante, controlada por termostato).

Los alimentos con una baja carga microbiana (excepto goma guar y de los alimentos sospechosos de estar contaminados con *S. typhi*). Incubar RV media 24 ± 2 horas a 42 ± 0,2 ° C (baño de agua circulante, controlado por termostato). Incubar TT caldo de 24 ± 2 h a 35 ± 2,0 ° C.

4.3. Agitar el tubo y estriar una asada de 3 mm (10 µ l) de caldo TT incubado en agar Bismuto sulfito (BS), agar Xilosa lisina desoxycolato (XLD), y Agar Hektoen

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

entérico (HE). Las placas de BS prepararlas el día anterior a ser usadas y almacenar en un lugar oscuro a temperatura ambiente hasta ser usadas.

- 4.4. Repita con una asada de 3 mm (10 µ l), del medio RV (para las muestras de alimentos de alta y baja carga microbiana) y de caldo SC (para goma guar).
- 4.5. Consulte a 994,04 en *Análisis de Métodos Oficiales (1)* para la opción de pre enriquecimiento de muestras refrigeradas incubadas y las muestras selectivas incubadas enriquecidas (solo caldos SC y TT), de los alimentos de baja humedad. Esta opción permite que los análisis de las muestras que se inició en fecha tan tardía como un jueves evite el trabajo de fin de semana.
- 4.6. Incubar las placas 24 ± 2 horas a 35 ° C.
- 4.7. Examinar las placas para determinar la presencia de colonias que pudieran ser *Salmonella*.

Morfología Típica de las colonias de *Salmonella*

Picar 2 o más colonias de *Salmonella* de cada agar selectivo después de 24 ± 2 h de incubación. Colonias típicas de *Salmonella* son las siguientes:

- a. **Agar Hektoen entérico (HE).** Colonias de azul-verdosas a azul, con o sin centro negro. Muchos cultivos de *Salmonella* pueden producir colonias con centros de negro brillantes o pueden aparecer casi completamente como colonias negras.
- b. **Agar Xilosa lisina desoxycholate (XLD).** Colonias rosadas, con o sin centros negros. Muchos cultivos de *Salmonella* pueden producir colonias con centros de negro brillantes o pueden aparecer casi completamente como colonias negras.
- c. **Agar Sulfito bismuto (BS).** Colonias marrones, grises o negras; a veces tienen un brillo metálico. Usualmente son medio marrones al principio, pero puede convertirse en negras cuando se les da un mayor tiempo de incubación, produciendo el llamado efecto halo.

Tome 2 o más colonias, si es que hay colonias típicas que están presentes en el agar BS después de 24 ± 2 h de incubación,. Independientemente de que sean picadas o no las colonias a las 24 ± 2 h. reincubar el agar BS por otras 24 ± 2 h adicionales. Después de 48 ± 2 h de incubación, picar 2 o más colonias típicas, solo si las colonias picadas de el agar BS incubadas a las 24 ± 2 h dieran reacciones

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

atípicas en agar TSI y agar LIA estos resultados podrían ser descartados como *Salmonella*. Véanse a continuación las secciones D.9 y D.10, para más detalles en la interpretación de reacciones de TSI y LIA.

Morfología atípica de las colonias de *Salmonella*

En ausencia de colonias típicas sospechosas de *Salmonella*, la búsqueda de colonias atípicas de *Salmonella* es como sigue:

- a. **Agares HE y XLD.** Atípicamente algunos cultivos de *Salmonella* producen colonias de color amarillo, con o sin centros negros. A falta de colonias típicas de *Salmonella* en los agares HE o XLD después de 24 ± 2 h de incubación, tome 2 o más colonias atípicas de *Salmonella*.
- b. **Agar BS.** Atípicamente algunas cepas producen colonias verdes, con poco o ningún oscurecimiento del medio. Si no están presentes colonias típicas o sospechosas en agar BS después de las 24 ± 2 h, no picar ninguna colonia pero reincubar 24 ± 2 h adicionales. Si no están presentes colonias típicas o sospechosas después de 48 ± 2 h de incubación, tome 2 o más colonias atípicas.

Sugerencia de control de cultivos

Además de los cultivos de control positivo (típica *Salmonella*), se recomiendan 3 cultivos adicionales de *Salmonella* para ayudar en la selección de colonias de *Salmonella* de morfología atípica en agares selectivos. Estos cultivos son un lactosa-positiva, H₂ S-positivos *S. diarizonae* (ATCC 12325) y un lactosa-negativos, H₂ S-negativos *S. Abortus equi* (ATCC 9842); O un lactosa-positiva, H₂ S-negativos *S. diarizonae* (ATCC 29934). Estas culturas pueden ser obtenidas de la **American Type Culture Collection**, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209.

- 4.8. Ligeramente toque el centro de la colonia para ser picadas con el asa de siembra estéril e inocular por estría en TSI plano inclinado y por puntura. Sin flamear, inocular en LIA por puntura doble y por estría en plano inclinado. Desde la decarboxilación de la lisina la reacción es estrictamente anaeróbica, el LIA debe tener una profundidad (4 cm). Conservar las placas de agar selectivo a 5-8 ° C.
- 4.9. Incubar TSI y LIA a 35 ° C por 24 ± 2 h. Tener los tubos sin apretar demasiado las tapas para mantener condiciones aerobias mientras se están

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

incubando para evitar la excesiva producción de H₂S. Un cultivo típico de *Salmonella* produce alcalinidad (rojo) en el plano inclinado y acidez (amarillo) en el fondo, con o sin producción de H₂S (ennegrecimiento de agar) en TSI. En LIA, *Salmonella* produce normalmente alcalinidad (púrpura) en el fondo. Considere sólo como reacción de acidez, amarillo en el fondo del tubo como negativo. No eliminar los cultivos que producen decoloración en el fondo del tubo únicamente sobre esta base. La mayoría de los cultivos de *Salmonella* producen H₂S en LIA. Algunos cultivos de no - *Salmonella* producen una reacción de color rojo ladrillo en LIA.

- 4.10. Todos los cultivos que dan una alcalinidad en el fondo en LIA, independientemente de la reacción de TSI, deben mantenerse como posibles aislamientos de *Salmonella* y presentado para pruebas bioquímicas y serológicas. Los cultivos de LIA que dan acidez en el fondo y alcalinidad en el plano inclinado y en TSI den acidez también deben de ser considerados aislamientos potenciales y se deben de ser presentado para pruebas bioquímicas y serológicas. Los cultivos que den en LIA acidez en el fondo del tubo y acidez en plano inclinado y acidez en el fondo del tubo en TSI puede ser descartado como no *Salmonella*. Guardar los cultivos de TSI presumiblemente-positivos como se indica en D-11, a fin de determinar si son especies de *Salmonella*, incluyendo *S. arizonae*. Si los cultivos de TSI no dan reacciones típicas de *Salmonella* (alcalinidad en el plano inclinado y ácida en el fondo) picar colonias sospechosas adicionales de un medio selectivo que no den cultivos presumibles - positivo e inocular en TSI y LIA, tal como se describe arriba en D-8.
- 4.11. Aplicar las pruebas de identificación bioquímicos y serológicos a:

- a. Tres presuntos cultivos de agar TSI recuperados de conjunto de placas estriadas de medio RV (o caldo SC para goma guar), si están presentes, 3 cultivos presuntivos en agar TSI recuperado de las placas estriadas del caldo TT.
- b. Si no se aislaron 3 cultivos presuntivos positivos en TSI de un conjunto de placas, probar otros cultivos presuntos positivos en agar TSI para las pruebas bioquímicas y serológicas. Examinar un mínimo de 6 cultivos de TSI de cada 25 g de unidad analítica o por cada 375 g de composito.

5. La identificación de *Salmonella*

5.1. Mezcla de cultivos.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

Estrie cultivos de agar TSI que parecieran estar mezclados en agar MacConkey, agar HE, o agar XLD. Incubar las placas 24 ± 2 horas a 35°C . Examinar las placas para determinar la presencia de colonias sospechosas de ser *Salmonella*.

- a. **Agar MacConkey.** Colonias típicas aparecen transparentes e incoloras, a veces con el centro oscuro. Las colonias de *Salmonella* pueden aclarar las zonas de precipitación de bilis causados por otros organismos a veces presentes.
- b. **Hektoen entérico (HE) agar.** Véase D-7 a -arriba.
- c. **Xilosa lisina desoxycholate (XLD) agar.** Véase D-7b, arriba. Transferir al menos 2 colonias sospechosas de ser *Salmonella* a TSI y LIA, tal como se describe en D-7, arriba, y continuar como en D-9, arriba.

5.2. Cultivos puros

- a. **Prueba de ureasa (convencional).** Con un asa estéril, inocular el crecimiento de cada uno de los TSI presuntivos positivos en los tubos de caldo urea. Ocasionalmente, tubos no inoculados de caldo urea se tornan de color púrpura-rojo (positivo), incluir un tubo no inoculado de este caldo como control. Incubar 24 ± 2 horas a 35°C .
- b. **Opcional prueba de ureasa (rápida).** Transferir dos asadas de 3 mm de crecimiento de cada uno de los presuntivos positivos de TSI en tubos de caldo urea rápida. Incubar 2 h en baño de agua a $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$. Descarte todos los cultivos que dieron positivo en la prueba. Conservar para un estudio más a fondo todos los cultivos que dieron prueba negativa (sin cambio de color del medio).

5.3. Prueba Serológica polivalente flagelar (H)

- a. Efectuar la prueba polivalente flagelar (H) ahora o después, como se describe en el E-5, a continuación. Inocular de cada uno de los TSI ureasa -negativo, ya sea en 1) Caldo BHI e incubar 4-6 horas a 35°C hasta que se produzca el crecimiento visible (en el mismo día), o 2) Caldo trypticasa de soja triptosa e incubar 24 ± 2 h a 35°C (al día siguiente). Añadir 2,5 mL de solución salina fisiológica formolizada a 5 mL de cualquiera de los cultivos.
- b. Seleccione 2 caldos de cultivo formolizados y probar con antisueros para *Salmonella* polivalente flagelar (H). Coloque 0,5 mL diluido apropiadamente del antisuero para *Salmonella* polivalente flagelar (H) en tubos de ensayo de 10 x 75 mm o 13 x 100 mm. Añadir 0,5 mL de antígeno que debe someterse a prueba. Prepare la solución salina

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

de control mediante la mezcla de 0,5 mL de solución salina fisiológica formolizada con 0,5 mL antígeno formolizado. Incubar las mezclas en baño de agua a 48-50 ° C. Observar a intervalos de 15 minutos y leer los resultados finales en 1 h.

Positivo - aglutinación en la mezcla y no aglutinación en el control.

Negativo - no aglutinación en la mezcla y no aglutinación en el control.

Inespecíficos - aglutinación en ambas mezcla y control. Prueba de los cultivos dan resultados con antisueros Spicer-Edwards.

5.4. Spicer-Edwards prueba serológica.

Use esta prueba como alternativa a la prueba polivalente flagelar (H). También puede ser usado con los cultivos que dan una aglutinación no específica en la prueba de polivalente flagelar (H). Realizar la prueba de anisueros de Spicer-Edwards flagelar (H) como se describe en el E, 3 B, arriba. Realizar otras pruebas bioquímicas (E, 5a-c, más adelante) en los cultivos que dieron positivo en los resultados de la prueba flagelar. Si ambos cultivos de caldos formolizados son negativos, realizar pruebas serológicas en 4 de caldo de cultivos adicionales (E, 3a, arriba). Si es posible, obtener 2 cultivos positivos por cada prueba bioquímica adicional (E, 5a-c, más adelante). Si todos los cultivos TSI ureasa negativo de la muestra dan resultados negativos para la prueba serológica flagelar (H), realizar pruebas bioquímicas adicionales (E, 5a-c, más abajo).

5.5. Análisis de cultivos ureasa negativo

- a. **Caldo Lisina descarboxilasa.** Si la prueba de LIA es satisfactoria, no es necesario repetir. Use caldo lisina descarboxilasa para la determinación final de la lisina descarboxilasa si el cultivo de LIA da una reacción dudosa. Inocular el caldo con una pequeña cantidad de TSI, sospechosas de *Salmonella*. Colocar la tapa herméticamente e incubar 48 ± 2 horas a 35 ° C, pero examinar a intervalos de 24 h. Especies de *Salmonella* causan reacción alcalina indicada por el color púrpura en todo medio. Prueba negativa es indicada por el color amarillo en todo el medio. Si parece medio descolorida (ni púrpura ni amarillo) se añaden unas gotas de 0,2% de púrpura de bromocresol y volver a leer las reacciones del tubo.
- b. **Caldo rojo fenol dulcitol o caldo púrpura base con 0,5% de dulcitol.** Inocular el caldo con una pequeña cantidad de crecimiento de cultivo de TSI. Coloque la tapa sin apretar e incubar 48 ± 2 horas a 35 ° C, pero examinar a las 24 h. La mayoría de las especies de *Salmonella* dan positivo en la prueba, indicada por la formación de gas en el interior del vial de fermentación y pH ácido (amarillo) del

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

medio. La producción de ácido debe interpretarse como una reacción positiva. La prueba negativa está indicada por la no formación de gas en el interior del vial de fermentación y color rojo (con rojo fenol como indicador) o púrpura (con bromocresol púrpura como indicador) a lo largo del medio.

c. **Caldo Triptona (o triptofano).** Inocular el caldo con el crecimiento del cultivo de agar TSI. Incubar 24 ± 2 horas a $35^\circ C$ y proceder de la siguiente manera:

1) **Caldo de cianuro de potasio (KCN).** Transferencia de 3 mm de una asada de caldo triptona de 24 h de cultivo para caldo KCN. Caliente el borde del tubo de modo que selle el tubo con un tapón de corcho recubierto de cera. Incubar 48 ± 2 horas a $35^\circ C$, pero examinar a las 24 h. Interprete el crecimiento (indicado por la turbidez) como positiva. La mayoría de las especies de *Salmonella* no crecen en este medio, como se indica por la falta de turbidez.

2) **Caldo Malonato.** Transferencia de 3 mm de asada de cultivo de 24 h de caldo triptona para caldo malonato. Ocasionalmente tubos no inoculados de caldo malonato se tornan azul (prueba positiva), incluir un tubo no inoculado de este caldo como control. Incubar 48 ± 2 horas a $35^\circ C$, pero examinar a las 24 h. La mayoría de las especies de *Salmonella* dan negativo en esta prueba (verdes o sin cambio de color).

3) **Prueba de Indol.** Transferencia de 5 mL de caldo triptona de 24 h para un tubo de ensayo vacío. Añadir 0.2-0.3 mL del reactivo de 'Kovacs'. La mayoría de las culturas *Salmonella* dan prueba negativa (escasez de color rojo de la profundidad a la superficie del caldo). Record intermedio de tonos de naranja y rosado será anotado como \pm .

4) **Pruebas serológicas flagelar (H) para *Salmonella*.** Si la prueba polivalente flagelar (H) (E-3, más arriba) o la prueba flagelar de Spicer-Edwards (H) (E-4, más arriba) no ha sido ya realizada, se puede realizar aquí.

5) Descartar como no *Salmonella* cualquier cultivo que muestre tanto positivo para la prueba de indol y negativo para la prueba flagelar (H), o positivo para la prueba de KCN y negativo para la prueba de lisina descaboxilasas.

5.6. Pruebas para *Salmonella* Serológicas somáticos (O)

(Pre-test all antisera to Salmonella with (Probar los antisueros de Salmonella en previas pruebas con cultivos conocidos.)

a. **Pruebas Polivalente somáticos (O).**

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

Usando un lápiz de cera, se marcan 2 secciones de 1 x 2 cm en el interior de cada uno de los vidrios o de placas Petri de plástico (15 x 100 mm). Comercialmente ya se encuentran láminas seccionadas para su uso. Emulsionar 3 mm de una asada del cultivo de TSI de 24-48 h o de preferencia, agar triptosa base sangre (sin sangre) con 2 mL de solución salina 0,85%.

Añadir 1 gota de la suspensión del cultivo en la parte superior de la porción superior de cada porción rectangular crayón de sección marcada. Añadir 1 gota de una solución salina a la parte inferior de una sección sola. Añadir 1 gota de antisuero *Salmonella* polivalentes somáticos (O) para otra sección sola. Con un asa de siembra estéril mezcle el cultivo en suspensión con la solución salina para una sección y repetir para otra sección que contenga antisuero. Inclinar la mezcla de un lado a otro por 1 minuto y observe contra un fondo oscuro de buena iluminación. Considerar cualquier grado de aglutinación una reacción positiva. Clasifique los resultados de las pruebas polivalentes somáticos (O) de la siguiente manera:

Positivo - aglutinación en la mezcla; no aglutinación en la solución salina de control.

Negativo - no aglutinación en la mezcla; no aglutinación en la solución salina de control.

Inespecíficos - aglutinación en la prueba y en las mezclas de control. Realizar más pruebas bioquímicas y serológicas que se describen en *Identificación de enterobacterias de Edwards y Ewing* (2).

b. Pruebas de grupos Somáticos (O)

Las pruebas como en E-6a, arriba, utilizan si es posible antisueños somáticos (O) de grupos individuales incluyendo Vi, en lugar de antisuero de *Salmonella* polivalente somático (O). Para el tratamiento especial de los cultivos que dan una reacción positiva de aglutinación Vi, se refieren a sec. 967.28B *Métodos Oficiales de Análisis* (1). La relación de los cultivos que dan positivo en aglutinación con antisuero somático individual (O) serán positivos para este grupo. La relación de cultivos que no reacciona con el antisuero somático individual (O) serán como negativo para este grupo.

5.7 Pruebas Bioquímicas adicionales.

Clasificar como *Salmonella* los cultivos que dan las reacciones típicas de *Salmonella* para las pruebas 1-11, se muestra en la Tabla 1. Si un cultivo de la TSI de 25 g de una unidad analítica está clasificado como *Salmonella*, la realización de nuevos ensayos de otros cultivos de TSI de la misma unidad analítica de 25 g es

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

innecesario. Cultivos que contienen antígenos de *Salmonella* demostrable como se muestra por la prueba de *Salmonella* flagelar (H) positiva, pero que no tienen características bioquímicas de *Salmonella* debe ser purificado (E - 1, arriba) y volver a realizar la prueba, a partir de E-2, arriba. Lleve a cabo las siguientes pruebas adicionales sobre los cultivos que no den reacciones típicas de *Salmonella* para las pruebas 1-11 en el Tabla 1 y que, por consiguiente, no se definen como *Salmonella*.

a. Caldo rojo de fenol lactosa o caldo púrpura lactosa.

1) Inocular el caldo con una pequeña cantidad de un cultivo sin clasificar de TSI 24-48 h . Incubar 48 ± 2 horas a 35 ° C, examinar después de 24 h.

Positivos - producción de acidez (amarillo) y producción de gas dentro del vial de fermentación. Considerar la producción de ácido como reacción positiva. La mayoría de cultivo de *Salmonella* da resultado negativo en las pruebas, indicado por la no formación de gas en el interior del vial de fermentación y color rojo (con rojo fenol como indicador) o púrpura (con púrpura bromocresol como indicador) en todo el medio

2) Descartar como no *Salmonella*, cultivos que den positivo en la prueba lactosa, excepto cultivos que den acidez en TSI y reacciones positivas en LIA, o cultivos que den reacción positiva en caldo malonato continuar con otras pruebas en estos cultivos para determinar si son *S. Arizonae*.

b. Caldo rojo fenol sucrosa o caldo púrpura sucrosa. Siga el procedimiento descrito en E, 7 a-1, arriba. Descartar como no *Salmonella*, los cultivos positivo en las pruebas de sucrosa, a excepción de las que dan acidez en TSI y reacciones positivas en LIA.

c. Caldo MR-VP. Inocular el medio con una pequeña cantidad de TSI sin clasificar con sospecha de contener *Salmonella*. Incubar 48 ± 2 horas a 35 ° C.

1) Realizar la prueba de Voges-Proskauer (VP) a temperatura ambiente de la siguiente manera: Transferir un 1 mL de un cultivo de 48 h a un tubo de prueba e incubar el resto del caldo MR-VP por un periodo adicional de 48 horas a 35 ° C. Agregar 0,6 mL α - Naftol y agitar. Agregar 0,2 mL de solución de KOH al 40% y agitar. Para intensificar y acelerar la reacción, añadir algunos cristales de creatina. Leer resultados después de 4 h; el desarrollo de un color rosa-a-color rojo rubí, en todo medio indica que la prueba es positiva. La mayoría de las culturas de *Salmonella* son VP negativo, indicado por falta de desarrollo de color rosa-a-color rojo en todo el caldo.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

2) Realizar la prueba de rojo de metilo de la siguiente manera: en 5 mL de 96 h MR-VP caldo, añadir 5-6 gotas de indicador rojo de metilo. Leer los resultados de inmediato. La mayoría de cultivo de *Salmonella* dan positivo en la prueba, por difusión del color rojo en el medio. A diferencia del color amarillo que es negativo. Descartar, como no *Salmonella*, cultivos que den positivo en las pruebas de KCN y VP y negativo en la prueba de rojo de metilo.

d. **Agar citrato de Simmons.** Inocular este agar, utilizando asa de siembra proveniente de TSI sin clasificar. Inocular por estrías en el plano inclinado y por punción en el fondo. Incubar 96 ± 2 horas a 35°C . Leer los resultados de la siguiente manera:

Positivo - presencia de crecimiento, por lo general acompañado por cambio de color de verde a azul. La mayoría de *Salmonella* es citrato-positivo.

Negativo -No crecimiento o muy poco crecimiento sin cambio de color.

5.8. Clasificación de los cultivos.

Clasificar, como *Salmonella*, los cultivos que tiene los patrones de reacción de la Tabla 1. Descartar, como no *Salmonella*, cultivos que dan resultados que figuran en la subdivisión de la Tabla 2. Realizar pruebas adicionales descritas en *Identificación de enterobacterias Edwards y Ewing (2)* para clasificar algún cultivo que no esté claramente identificado como *Salmonella* en la clasificación de la Tabla 1 o la eliminación como no *Salmonella* por las prueba de la Tabla 2. Si ninguno de los 2 de cultivos de TSI que fueron llevadas a través de las pruebas bioquímicas confirma el aislamiento como *Salmonella*, realizar pruebas bioquímicas, comenzando con E-5, o quedarse con un cultivo de TSI ureasa negativo de alguna muestra de una unidad analítica de 25 g .

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

5.9. Anexos:

Tabla 1. Bioquímica y reacciones serológicas de <i>Salmonella</i>			
Prueba o sustrato	Resultados		<i>Salmonella</i> especies Reacción ^(a)
	Positivo	Negativo	
1. Glucosa (TSI)	Amarillo en el fondo	Rojo en el fondo	+
2. Lisina descarboxilasa (LIA)	púrpura en el fondo	Amarillo en el fondo	+
3. H ₂ S (TSI y LIA)	Ennegrecimiento	No ennegrecimiento	+
4. Ureasa	Color púrpura-rojo	Ningún cambio de color	--
5. Caldo Lisina descarboxilasa	Color púrpura	Color amarillo	+
6. Caldo Rojo fenol dulcitol	Color amarillo y / o gas	Sin gas, sin cambio de color	+ ^(B)
7. caldo KCN	Crecimiento	No crecimiento	--
8. Malonato caldo	Color azul	Ningún cambio de color	-- ^(C)
9. Prueba de indol	Color violeta en la superficie	Color amarillo en la superficie	--
10. Prueba Polivalente flagelar	Aglutinación	No aglutinación	+
11. Prueba Polivalente somáticos	Aglutinación	No aglutinación	+
12. Caldo Lactosa rojo fenol	Color amarillo y / o gas	Sin gas, sin cambio de color	-- ^(C)
13. Caldo Rojo fenol sacarosa	Color amarillo y / o gas	Sin gas, sin cambio de color	--
14. Prueba Voges Proskauer	Color rosa-a- rojo	Ningún cambio de color	--
15. Prueba de rojo de metilo	Color rojo difuso	Color amarillo difuso	+
16. Citrato de Simmons	Crecimiento; color azul	Sin crecimiento, sin cambio de color	V

^A +, el 90% o más positivos en 1 o 2 días; -, el 90% o más negativas en 1 o 2 días; v, variable.

Reemplaza a: Manual de DIGESA
 Revisión: 00
 Fecha: Octubre del 2001

MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES

Código:
 Revisión: 01
 Elaborado por: MAP
 Revisado por: ASM
 Aprobado por: MAG
 Fecha: Agosto, 2009

^B Mayoría de cultivos *S. Arizonae* son negativos.

^C Mayoría de cultivos *S. Arizonae* son positivos.

Tabla 2. Criterios para el descarte de cultivos de no *Salmonella*

Prueba o sustrato	Resultados
1. Ureasa	Positivo (color púrpura-rojo)
2. Prueba de indol y Prueba de Polivalente flagelar (H);	Positivo (color violeta en la superficie) Negativo (no aglutinación)
o Prueba de Indol y Prueba de Spicer-Edwards flagelar	Positivo (color violeta en la superficie) Negativo (no aglutinación)
3. Caldo Lisina descarboxilasa y caldo KCN	Negativo (color amarillo) Positivo (crecimiento)
4. Caldo Lactosa rojo fenol	Positivo (color amarillo y / o gas) (a), (b)
5. Caldo Sacarosa rojo fenol	Positivo (color amarillo y / o gas) (b)
6. Caldo KCN , Prueba de Voges Proskauer, y Prueba de rojo de metilo	Positivo (crecimiento) Positiva (rosa-a-color rojo) Negativo (difusa de color amarillo)

^a Prueba en caldo malonato de cultivos positivos determinar si son *S. Arizonae*.

^B No desechar caldo de cultivos positivos si corresponden a cultivos de LIA que dan reacciones típicas de *Salmonella*; realizar más pruebas para determinar si son especies de *Salmonella*.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

CAPITULO II. ANÁLISIS DE BIOTOXINAS MARINAS

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

INDICE

SECCIÓN I. MÉTODO BIOLÓGICO PARA LA DETERMINACION DE TOXINA PARALIZANTE PSP.

SECCIÓN II. MÉTODO DEL BIOENSAYO EN RATON PARA DETECCIÓN DE TOXINAS LIPOFÍLICAS.

SECCIÓN III. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO DOMOICO (biotoxina ASP) EN MOLUSCOS BIVALVOS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO (HPLC).

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

**SECCIÓN I. MÉTODO BIOLÓGICO PARA LA DETERMINACION DE TOXINA PARALIZANTE PSP
AOAC 959.08, 18th ED. 2005. Paralytic Shellfish Poison Biological Method.**

ENSAYO : DETERMINACION DE TOXINA PARALIZANTE - PSP

PRODUCTO : MOLUSCOS BIVALVOS, EQUINODERMOS, GASTEROPODOS MARINOS Y TUNICADOS.

- **REFERENCIA** :

- AOAC Official Method 959.08, 18th ed. 2005. Current through Revision 2, 2007. Paralytic Shellfish Poison Biological Method.
- Reglamento (CE) 853/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 29 de abril de 2004. Por la que se establecen normas específicas de los alimentos de origen animal.

El presente ensayo cuantitativo es aplicable a los análisis de toxinas PSP en moluscos, permitiendo la cuantificación de las toxinas en las muestras analizadas. El límite de detección depende de la cepa de ratones utilizada, oscilando usualmente entre 32 y 48 $\mu\text{g STX eq. } 100 \text{ g}^{-1}$ de carne.

El bioensayo en ratón permite la determinación de la toxicidad global producida por las toxinas PSP presentes en la muestra. El bioensayo se basa en el efecto tóxico causado por un extracto ácido de la muestra analítica, inoculado intraperitonealmente en ratones albinos de aproximadamente 20 g de peso.

Las toxinas PSP se extraen en caliente mediante una maceración acuosa en medio ácido de toda la carne del bivalvo previamente triturada. Posteriormente se inyecta 1 mL de extracto a cada uno de 3 ratones y se registra el tiempo de muerte (TM). Con los datos del peso del ratón, dilución del extracto y tiempo transcurrido hasta su muerte se calcula la toxicidad en unidades de ratón (UR). Se

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

define la UR como la cantidad de toxina que produce la muerte de un ratón de 20 g en 15 min. Con ayuda de las tablas de Sommer y del factor de conversión (FC) se transforman en μg de equivalentes de STX por 100 g de molusco (μg STX eq. 100 g^{-1} de carne).

1. EQUIPOS Y MATERIALES.

- Licuadora común.
- Balanza analítica digital.
- Plancha calefactora.
- Centrífuga.
- Potenciómetro.
- Timers.
- Termómetro digital.
- Vaso de precipitado de 600 mL
- Probetas de 100 y 250 mL.
- Pipetas graduadas de 5 y 10 mL.
- Vasos de licuadora de 500mL y de 1 lt.
- Varillas de vidrio o baguetas.
- Tijeras.
- Tubos de centrifuga Falcon de 50 mL
- Jeringas estériles descartables para insulina de 1 mL
- Espátulas y cucharas de acero inoxidable.
- Guantes descartables de látex.
- Tamiz o colador de acero inoxidable N°10 con abertura de malla de 1 o 2 mm aprox.
- Papel secante o absorbente.
- Papel toalla.

2. REACTIVOS.

- Solución patrón estándar de STX de concentración $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$.
- Solución patrón de trabajo de STX de $1\ \mu\text{g mL}^{-1}$ en el caso de utilizar el patrón de la FDA, diluir 1 mL de solución patrón estándar en 100 mL de agua destilada.
- Ácido Clorhídrico (HCl) 0.1 M
- Ácido Clorhídrico (HCl) 5 M.
- Agua acidulada con HCl (pH aprox. 3).
- Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 M

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

3. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Ratones albinos machos sanos de 19-21g de peso procedentes de una colonia estandarizada. Si el peso es menor o mayor de 20 g aplicar el factor de corrección correspondiente para obtener las UR corregidas (URC).

No utilizar ratones con un peso superior a 23 g.

No reutilizar los ratones.

4. PROCEDIMIENTO

4.1 Extracción

- Pesar 100 g del homogenizado en un vaso de precipitado previamente tarado.
- Añadir 100 mL de HCl 0.1 M y agitar vigorosamente.
- Ajustar el pH entre 3.0 y 4.0. Para disminuir el pH, añadir HCl 5M gota a gota y agitando; para aumentar el pH, añadir NaOH 0.1 M gota a gota y agitar constantemente para **prevenir una alcalinización local y la consecuente destrucción de la toxina**
- Calentar el homogenizado en plancha calefactora, manteniendo en ebullición suave durante 5 min.
- Enfriar en baño de agua fría.
- Transferir el homogenizado a una probeta graduada y enrasar hasta 200 mL.
- Retornarlo al vaso de precipitado mezclando para homogenizar y dejando reposar hasta que el sobrenadante sea traslúcido.
- Si es necesario, centrifugar el homogenizado o el sobrenadante durante 5 minutos a 3000 RPM.

4.2 Bioensayo en ratón

- Inocular intraperitonealmente 3 ratones cada uno con 1 mL del extracto ácido obtenido.
- Utilizar un timer para estimar el Tm del ratón, determinado por el último movimiento respiratorio (boqueado).
- Si el Tm o la mediana del Tm de varios ratones es < 5 min, diluir el extracto hasta obtener tiempos de muerte comprendidos entre 5 y 7 min. Si es necesario realizar grandes diluciones, ajustar el pH entre 2 y 4 adicionando gota a gota HCl 0.1 N. Inocular un mínimo de tres ratones con el extracto o dilución que produce tiempos de muerte entre 5 y 7 min. Si el Tm de uno o dos ratones inoculados con el extracto no diluido de la muestra es > 7 min.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

(o hay supervivencia), debe inocularse un total de 3 ó más ratones para establecer la toxicidad de la muestra.

4.3 Cálculo de la toxicidad

- Determinar el Tm de cada uno de los ratones, incluyendo, en su caso, los supervivientes.
- Calcular las UR correspondientes utilizando la tabla N° 2-1 (tabla de Sommer). Considerar que el Tm de los ratones supervivientes es > 60 min o equivalente a 0.875 unidades de ratón.
- Corregir las UR obtenidas para cada ratón multiplicando por el FC del peso de ese ratón obtenido en la tabla de corrección de peso (Tabla 2-2).
- Calcular la mediana de las UR corregidas (URC) del grupo. Las URC se convierten en toxicidad PSP, expresada como $\mu\text{g STX eq. } 100 \text{ g}^{-1}$ de carne mediante la fórmula:

$$\mu\text{g STX eq. } 100 \text{ g}^{-1} = \text{URC} \times \text{FC} \times \text{factor de dilución} \times 200.$$

Un valor superior a $80 \mu\text{g STX eq. } 100 \text{ g}^{-1}$ se considera peligroso y hace que el alimento no sea apto para el consumo.

4.4 Estandarización del ensayo. Cálculo del factor de conversión (FC)

- Diluir alícuotas de 10 mL de la solución patrón de STX de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ con 10, 15, 20, 25 y 30 mL de agua acidulada.
- Inocular intraperitonealmente dosis de 1 mL de las diferentes diluciones a cada uno de 5 ratones para producir una mediana de Tm entre 5 y 7 min. El pH de las diluciones deberá estar comprendido entre 2 y 4 (vigencia del valor de Fc = 1 año).
- Adicionalmente ensayar diluciones que se diferencien en +/- 1 mL de agua acidulada de la dilución que proporcione un Tm entre 5 y 7 minutos.
- Repetir el ensayo uno o dos días después, con las 3 diluciones anteriormente preparadas.
- Posteriormente repetir el ensayo completo con diluciones preparadas a partir de una nueva solución patrón de trabajo.
- Calcular la mediana del Tm para cada grupo de 10 ratones utilizados con cada dilución.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

- Si todos los grupos de 10 ratones inoculados con cualquier dilución dan medianas de Tm <5 o >7 min., descartar los resultados de esta dilución en los cálculos posteriores.
- Si cualquiera de los grupos de 10 ratones inoculados con una dilución dan una mediana de Tm entre 5 y 7 min., incluir todos los grupos de 10 ratones utilizados en esa dilución, aunque algunos de los Tm medianos pueda ser <5 o >7 min.
- A partir de la mediana del Tm de cada grupo de 10 ratones para cada una de las diluciones seleccionadas, determinar el número de UR/mL utilizando la tabla de Sommer (tabla N° 2-1)
- Dividir los ug de STX/mL calculados entre las UR/mL para obtener el Fc., que expresa los ug equivalentes de STX para una UR. Calcular el promedio de los valores Fc individuales y usar este promedio como punto de referencia para controlar los análisis rutinarios.

5.5 Verificación del factor de conversión en los análisis rutinarios.

- Comprobar periódicamente el Fc. Si los análisis se realizan con una frecuencia inferior a una vez por semana, determinar el valor del Fc cada día que se llevan a cabo los análisis, inoculando para ello 5 ratones con la solución patrón de trabajo apropiada (STX).
- Si la frecuencia analítica es de varios días a la semana únicamente se hará un control semanal con la dilución del patrón que proporcione una mediana de Tm comprendida entre 5 y 7 min.
- El valor del Fc determinado deberá contrastarse con el valor Fc promedio siendo la diferencia con él superior al ± 20 %. De no ser así completar el grupo de 10 ratones añadiendo 5 ratones a los ya inoculados, e inocular un segundo grupo de 10 ratones con la misma dilución del patrón.
- Promediar el valor del Fc determinado para el segundo grupo con el valor del Fc del primer grupo. Este es el nuevo valor de Fc.

6. ANEXOS

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

Tabla N° 2-1. Tabla de Sommer con las relaciones entre tiempo de muerte y unidades ratón (UR) para PSP

Tiempo de muerte (min y s)	Unidades de ratón (UR)	Tiempo de muerte (min y s)	Unidades de ratón (UR)
1:00	100	5:00	1.920
10	66.2	05	1.890
15	38.3	10	1.860
20	26.4	15	1.830
25	20.7	20	1.800
30	16.5	30	1.740
35	13.9	40	1.690
40	11.9	45	1.670
45	10.4	50	1.640
50	9.33		
55	8.42	6:00	1.600
		15	1.540
2:00	7.67	30	1.480
05	7.04	45	1.430
10	6.52		
15	6.06	7:00	1.390
20	5.66	15	1.350
25	5.32	30	1.310
30	5.00	45	1.280
35	4.73		
40	4.48	8:00	1.250
45	4.26	15	1.220
50	4.06	30	1.200
55	3.88	45	1.180
3:00	3.7	9:00	1.160
05	3.57	30	1.130
10	3.43		
15	3.31	10:00	1.110
20	3.19	30	1.090
25	3.08		
30	2.98	11:00	1.075
35	2.88	30	1.060
40	2.79		
45	2.71	12:00	1.050
50	2.63		
55	2.56		

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

Tiempo de muerte (min y s)	Unidades de ratón (UR)	Tiempo de muerte (min y s)	Unidades de ratón (UR)
		13	1.030
		14	1.015
4:00	2.5	15	1.000
05	2.44	16	0.990
10	2.38	17	0.980
15	2.32	18	0.972
20	2.26	19	0.965
25	2.21	20	0.960
30	2.16	21	0.954
35	2.12	22	0.948
40	2.08	23	0.942
45	2.04	24	0.937
50	2.00	25	0.934
55	1.96	30	0.917
		40	0.898
		60	0.875

AOAC 958.08 (2005) Shellfish Poison Biological Method

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

Peso Ratón (g)	Unidades de ratón (UR)
10.0	0.500
10.5	0.530
11.0	0.560
11.5	0.590
12.0	0.620
12.5	0.650
13.0	0.675
13.5	0.700
14.0	0.730
14.5	0.760
15.0	0.785
15.5	0.810
16.0	0.840
16.5	0.860
17.0	0.880

Tabla N° 2-2. Valores de corrección según el peso de los ratones

17.5	0.905
18.0	0.930
18.5	0.950
19.0	0.970
19.5	0.985
20.0	1.000
20.5	1.015
21.0	1.030
21.5	1.040
22.0	1.050
22.5	1.060
23.0	1.070

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

SECCIÓN II. MÉTODO DEL BIOENSAYO EN RATÓN PARA DETECCIÓN DE TOXINAS LIPOFÍLICAS

ENSAYO : *DETECCIÓN DE ACIDO OKADAICO, DINOFIGITOXINAS, PECTENOTOXINAS, AZASPIRÁCIDOS Y YESSOTOXINAS.*

PRODUCTO : *MOLUSCOS BIVALVOS, EQUINODERMOS, GASTEROPODOS MARINOS Y TUNICADOS.*

REFERENCIA :

- *Reglamento (CE) 853/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 29 de abril de 2004. Por la que se establecen normas específicas de los alimentos de origen animal.*
- *Procedimiento para detección de AO, DTXS, PTXS Y AZAs en el extracto de diclorometano y detección de YTXs en extracto metanólico. (Yasumoto et al, en prep. Protocolo2) Fernández. M.L; Miguez, A; Cacho, E.; Martínez, A. Diogène, J & Yasumoto, T. 2002. En "Floraciones algales nocivas en el cono sur americano. Sar, Ferrerio & Reguera, editores. Instituto Español de Oceanografía: pg. 77-120.*
- *Yasumoto, T; Murata, M; Oshima, Y; Matsumoto, G.K. & Clardy, J. 1984 a. Diarrhetic Shellfish Poisoning. En "Seafood Toxins, ACS Symposium Series 262" Ragelis editor. American Chemical Society, Washington, D.C., USA: 207-214*
- *Yasumoto, T.; Oshima, & Yamaguchi, M. 1978. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in tohoku district. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 44:1249-1255.*

El presente método de ensayo tiene por objeto establecer las pautas a seguir en la detección de Acido okadaico (AO), dinofisistoxinas (DTXs),

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

Pectenotoxinas (PTXs), Yessotoxinas (YTXs) y azaspirácidos (AZAs) en moluscos bivalvos, equinodermos, gasterópodos marinos y tunicados mediante el bioensayo en ratón. Dependiendo del objetivo del ensayo se puede optar por diferentes protocolos.

El bioensayo en ratón de Yasumoto et.al 1978 permite la detección conjunta de AO, DTXs, PTXs y YTXs a partir del hepatopaneas del molusco. Se basa en el efecto toxico agudo de un extracto acetónico de la muestra analítica, evaporado y redissuelto en una solución acuosa de tween 60. Este extracto se inocula intraperitonealmente en ratones de aprox. 20 g de peso. La determinación de la toxicidad se realiza en función del tiempo de muerte (T_m) de los ratones inoculados.

En el caso de observar síntomas de de PSP o ASP en los ratones se sigue el bioensayo en ratón de Yasumoto et.al 1984 en cual se basa en el efecto toxico agudo de una extracción acetónico/metanólico purificados por una partición líquido /líquido con éter dietílico o diclorometano y agua; evaporado y redissuelta en una solución acuosa de Tween 60. Este extracto es inoculado intraperitonealmente en ratones de 20 g de peso. La determinación de la toxicidad se realiza en función del tiempo de muerte de los ratones inoculados con 1mL del extracto. En este caso se parte de una muestra de hepatopaneas la cual solo permite detectar AO, DTXs, PTXs y YTXs; pero no AZAs pues su extracción cuantitativa se realiza a partir de cuerpo entero.

El protocolo de Yasumoto et al.2002, "Método biológico para la detección de AO, DTXs, PTXs, YTXs y AZAs en cuerpo entero de los moluscos", permite la determinación sobre el cuerpo entero de los moluscos de la presencia y ausencia de estas toxinas a los niveles establecidos por "Reglamento (CE) 853/2004".

El AO, DTXs, PTXs, YTXs y AZAs son sustancias polietéreas, si bien todas estas se extraen con acetona, el AZAs requiere una segunda extracción con metanol para poder ser detectable en los niveles del reglamento. Este, previamente se purifica con una partición líquido/líquido el cual es evaporado y luego se resuspende en Tween 60 al 1%, se inocula intraperitonealmente a tres ratones albinos, determinándose la toxicidad en función del tiempo de muerte.

En el caso de que se sospeche la presencia de YTXs en la muestra que enmascare a las otras toxinas lipofílicas se puede utilizar el protocolo 2 de Yasumoto et al.2002 llamado "Procedimiento para detección de AO, DTXs,

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

PTXs, y AZAs en el extracto de diclorometano y detección de YTXs en extracto metanólico". Incluye la realización de una partición liquido/liquido entre diclorometano y metanol acuoso (60%) que permite determinar la presencia de AO, DTXs, PTXs, y AZAs a niveles superiores a los regulados en la legislación europea en el extracto de diclorometano, y la presencia de YTXs a niveles superiores a 1 mg /Kg en el extracto metanólico, esto permite abordar la implantación del reglamento (CE) 853/2004.

1. EQUIPOS Y MATERIALES

- Licuadora común.
- Balanza analítica digital.
- Rota evaporador. de vacio
- Campana de extracción para solventes.
- Baño de agua termostatizado.
- Balones adaptables al rotaevaporador de 3000 mL de capacidad.
- Sonicador o ultrasonido.
- Plancha calefactora.
- Tamiz de acero inoxidable N°10 con abertura de malla de 1 o 2 mm aprox.
- Soporte universal o soporte múltiple para peras.
- Matraces Erlenmeyer de 250 y 500 mL.
- Embudos.
- Peras de decantación de 250 mL
- Jeringas estériles de tuberculina de 1 mL descartables
- Pipetas de 5, 10 y 25 mL.
- Papel de aluminio
- Papel secante o absorbente.
- Papel de filtro.
- Vasos de precipitado de 250, 500 y 1000 mL.
- Probetas de 50, 100 y 1000 mL de volumen.
- Pipetas Pasteur.
- Recipientes de plástico
- Bandejas rectangulares de acero quirúrgico.
- Tijeras.
- Bolsas de plástico.

2. REACTIVOS

- Acetona grado reactivo

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

- Metanol grado reactivo
- Butanol grado reactivo.
- Diclorometano grado reactivo.
- Agua destilada.
- Solución de Tween 60 al 1% en agua destilada.

3. ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Ratones albinos machos sanos, preferentemente de cepa Swiss u otra cepa, de 19-21g de peso procedentes de una colonia estandarizada

4. PROCEDIMIENTO

- Si el objetivo del ensayo es determinar la presencia de OA, DTXs, PTXs y YTXs en la muestras, se ensayara solo el hepatopancreas y se podrá utilizar el procedimiento "D.1". En caso se sospeche de interferencia de PSP o ASP se utilizara el procedimiento "D.2".
- Si el objetivo del ensayo es determinar la presencia de OA, DTXs, PTXs, YTXs y además AZAs, se ensayara cuerpo entero siguiendo el protocolo "D.3". Si se tiene sospecha de interferencias con YTXs se procederá a utilizar el protocolo "D.4".
- Si después de utilizar el protocolo "D.2" a partir de hepatopancreas, se sospecha de interferencia con YTXs se recomienda utilizar el protocolo "D.4" a partir del cuerpo entero.

4.1) PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE OA, DTXS, PTXS Y YTXS EN HEPATOPANCREAS

El presente procedimiento es aplicable a los análisis de ácido okadaico (AO) y dinofisitoxinas (DTXs), pectenotoxinas (PTXs), y yesotoxinas (YTXs) en moluscos bivalvos. El límite de detección es 0.8 µg de AO eq. ·g⁻¹ hepatopancreas.

El AO y derivados, las PTXs y las YTXs son sustancias polietéreas liposolubles extraíbles con acetona. El bioensayo en ratón de *Yasumoto et al. (1978)* permite su detección conjunta, proporcionando una única respuesta a todas las sustancias activas de la muestra.

4.1.1. Extracción

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

- Pesar 25 g del homogeneizado de HP (hepatopáncreas) en un vaso de precipitados previamente tarado.
- Añadir 50 mL de acetona y homogeneizar durante 2-3 min. Dejar sedimentar la fase sólida.
- Filtrar el sobrenadante a través de papel de filtro, recogiéndolo en el balón adaptable al rotavapor.
- Repetir los mismo pasos de extracción dos veces más, utilizando 50 mL de acetona en cada ocasión. Recoger los dos nuevos filtrados en el mismo matraz colector.
- Evaporar a sequedad el extracto acetónico en el rotavapor, con el baño de agua a una temperatura de aproximadamente 40 °C (nunca superior a 45 °C).
- Redisolver el residuo con una solución acuosa de Tween 60 al 1%, previamente atemperada a 40 °C de tal forma que el volumen final de inóculo sea aproximadamente 5 mL.
- La relación peso / volumen a obtener será de aproximadamente 5 g de HP iniciales por mL de solución acuosa de Tween 60 al 1%.

4.1.2. Bioensayo en ratón

- Inocular por vía intraperitoneal 1 mL. de la solución a tres ratones de 19 - 21g de peso.
- Mantener los ratones en observación 24 horas.
- En el caso de observar en los ratones una sintomatología que pudiera indicar interferencias de biotoxinas PSP o ASP se seguirá el procedimiento alternativo.

4.1.3. Interpretación de resultados

- El bioensayo se considera positivo a la presencia de OA, DTXs, PTXs y YTXs cuando se produce la muerte de al menos 2 de los 3 ratones inyectados dentro de las 24 horas.

4.2) PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO PARA ELIMINAR INTERFERENCIAS CON TOXINAS PSP O ASP

En el caso de observar síntomas de PSP o ASP en los ratones, se seguirá el procedimiento de *Yasumoto et al. (1984)* que se describe a continuación.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

Los equipos y materiales, reactivos, animales de experimentación del protocolo anterior son de aplicación en el procedimiento alternativo.

4.2.1. Extracción

- Pesar 25 g del homogenizado de hepatopancreas en un vaso de precipitado previamente tarado.
- Añadir 50 mL de acetona y homogenizar durante 2 -3 min. Dejar sedimentar la fase sólida.
- Filtrar el sobrenadante a través de papel filtro, recogiéndolo en un matraz colector adaptable al rotavapor.
- Repetir los mismos pasos de extracción dos veces más, utilizando 50 mL de acetona en cada ocasión.
- Recoger los dos nuevos filtrados en el mismo matraz colector. Evaporar el extracto acetónico final en rotavapor con el baño de agua aprox. 40 ° C (nunca > 45° C). No es necesario evaporar totalmente el agua residual.
- Añadir al extracto residual un pequeño volumen de agua de manera que el volumen final del extracto sea aprox. 15 mL. Trasvasar el extracto a un embudo de decantación.
- Arrastrar los restos del residuo que pudieran permanecer en el matraz colector con 50 mL de éter dietílico y combinar este extracto etéreo con el extracto acuoso en el embudo de decantación.
- Agitar suavemente invirtiendo varias veces el embudo (evitar agitación vigorosa para prevenir la formación de emulsiones).
- Dejar en reposo para permitir la separación de las dos fases.
- Separar la fracción acuosa y reservar la fracción etérea. Extraer la fracción acuosa dos veces más con 50 mL de éter dietílico. Combinar las fracciones etéreas y realizar dos lavados adicionales del extracto etéreo con 15 mL de agua.
- Descartar las fracciones acuosas y evaporar el extracto etéreo a sequedad.
- Redisolver el residuo con una solución acuosa de Tween 60 al 1 %, previamente atemperada a aprox. 40 ° C de tal forma que el volumen final de inóculo sea 5 mL. La relación P/V a obtener será de 5 g de HP por cada mL de Tween 60 al 1 %.

4.2.2. Bioensayo en ratón

- Inocular por vía intraperitoneal 1 mL de la solución a tres ratones de 19-21 g de peso y observar por 24 horas.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

4.2.3. Interpretación de resultados

- El bioensayo se considera positivo a la presencia de OA, DTXs, PTXs, y YTXs cuando se produce la muerte de al menos 2 de los 3 ratones dentro de las 24 horas.

Nota: La sustitución del éter dietílico por diclorometano mejora la extractabilidad de las Yesotoxinas.

4.3) PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE OA, DTXS, PTXS, YTXS Y AZAS, A PARTIR DE CUERPO ENTERO.

Este método es de aplicación a los análisis de Ácido okadaico (AO), Dinofisistoxinas (DTXs), Pectenotoxinas (PTXs), Yesotoxinas (YTXs) y Azaspirácidos (AZAs) en moluscos bivalvos. El presente ensayo (*Yasumoto et al. 2002 protocolo 1*) permite la determinación sobre el cuerpo entero de los moluscos de la presencia o ausencia de estas toxinas a los niveles establecidos en el "reglamento (CE) 853/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO" de 29 de abril de 2004.

4.3.1. Extracción.

- Pesar 100 g del homogenizado de carne del molusco en un vaso de precipitados.
- Añadir 300 mL de acetona y homogeneizar durante 2 min. Filtrar a través de papel filtro reservando el filtrado.
- Extraer el residuo con 300 mL de metanol, homogenizando durante 2 min. Filtrar este segundo extracto a presión reducida.
- Combinar los extractos acetónico y metanólico en un balón adaptable a rota evaporador, preferentemente de 2 litros. Añadir 20 - 25 mL butanol (nunca mas de 50 mL) para prevenir la formación de espumas.
- Evaporar hasta casi sequedad, no exceder de 45° C.
- Transferir el residuo con 100 mL de solvente seleccionado para la partición a una pera de decantación.
- Añadir a la pera 50 mL de agua agitando e invirtiendo suavemente varias veces (evitar agitación vigorosa).
- Dejar en reposo para permitir la separación de las dos fases.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

- Reservar la fase orgánica y recoger la fase acuosa llevándola a otro embudo de decantación.
- Lavar la fase acuosa con 20 mL adicionales de solvente orgánico.
- Dejar en reposo para separar las dos fases.
- Descartar la fase acuosa y combinar las fases orgánicas.
- Transferir el extracto combinado a un balón adaptable al rota evaporador evaporando hasta sequedad.
- Reextraer mediante sonicación adicionando 16 mL de metanol. Tras unos minutos de reposo separar el sobrenadante.
- Evaporar a sequedad el extracto metanólico y resuspender en Tween 60 al 1 % transfiriéndolo a un tubo graduado de manera que el volumen final sea de 4 mL.
- La relación peso/ volumen a obtener es de 25 g de carne iniciales por cada mL de solución acuosa de Tween 60 al 1 %.

4.3.2. Bioensayo en ratón

- Inocular por vía intraperitoneal 1mL de la solución a tres ratones de 19-21 g de peso y observar por 24 horas.

4.3.3. Interpretación de resultados

La muerte de 2 de 3 ratones en 24 horas podría ser interpretada como la presencia de una o mas toxinas liposolubles (AO, DTXs, PTXs, YTXs y AZAs) a niveles superiores a los establecidos en "Reglamento (CE) 853/2004". Aunque esta asunción es correcta en el caso de toxinas de los grupos AO, DTXs, PTXs y AZAs, si hay YTXs en las muestras a analizar se pueden producir resultados positivos incluso si estas sustancias se encuentran a niveles muy por debajo del nivel regulatorio de 1 mg kg^{-1} ($160 \mu\text{g equiv. YTX kg}^{-1}$ pueden producir la muerte en los ratones). Se puede sospechar la presencia de YTXs o su co-ocurrencia con las otras toxinas del grupo si los ratones mueren antes de 6 h con síntomas similares a los producidos por la toxina PSP (convulsiones y saltos), aunque este tipo de muerte puede ser también ocasionado por la presencia de niveles elevados de algunas toxinas de los otros grupos regulados en el reglamento.

Si los ratones mueren entre las 6 y 24 horas, es muy improbable que las YTXs estén presentes en las muestras, o bien que contribuyan a su toxicidad de forma significativa, de manera que este resultado se puede

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

interpretar como la presencia de una o más toxinas de los siguientes grupos: OA, DTXs, PTXs y AZAs a niveles superiores a los establecidos en la decisión "Reglamento (CE) 853/2004".

4.4) PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE OA, DTXS, PTXS, Y AZAS EN EL EXTRACTO DE DICLOROMETANO Y DETECCIÓN DE YTXS EN EXTRACTO METANÓLICO.

En el caso de que se sospeche la presencia de YTXs en la muestra, que enmascaren a las otras toxinas lipofílicas (OA, DTXs, PTXs, y AZAs) se aplicara el presente procedimiento que reproduce al de *Yasumoto et al.2002 protocolo 2*.

4.4.1. Extracción.

- Pesar 100 g del homogenizado del cuerpo entero del molusco en un vaso de precipitado previamente tarado.
- Añadir 300 mL de acetona y homogenizar con una licuadora durante 2 min. Filtrar a través de papal filtro y recoger el filtrado en un matraz Erlenmeyer reservándolo.
- Extraer el extracto residual con 300 mL de metanol homogenizando durante 2 min. Filtrar este segundo extracto.
- Combinar los extractos acetónico y metanólico en un balón colector de 3 litros adaptable a rotavapor.
- Añadir 20 - 25 mL de butanol (nunca más de 50 mL) para prevenir la formación de espumas.
- Evaporar el extracto acetónico-metanólico hasta casi sequedad, a una temperatura de baño de agua no mayor a 45° C. No es necesario evaporar totalmente el agua residual.
- Añadir al extracto residual una mezcla de 30 mL de diclorometano con 60 mL de metanol:- agua al 60 %, arrastrando cualquier resto del residuo que permanezca en el balón (es importante que ambos solventes estén saturados uno con el otro, para evitar la formación de emulsiones). Transferir a una pera de decantación.
- Agitar suavemente la pera de decantación y dejar reposar (evitar la agitación vigorosa para prevenir la formación de emulsiones)
- Separadas ambas fases colector la fracción de diclorometano y reservar la fracción metanólica.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

- Extraer la fracción de diclorometano 2 veces más con 60 mL de metanol al 60 % y combinar los extractos metanólicos reservados.
- Evaporar el extracto de diclorometano. El residuo obtenido se reextrae mediante sonicación con 16 mL de metanol. Dejar reposar unos minutos y separar el sobrenadante.
- Llevar el extracto metanólico reservado a 200 mL con metanol. Tomar 16 mL de esta solución y evaporar.
- Resuspender cada residuo (diclorometano y metanol) con una solución acuosa de Tween 60 al 1% y transferirlo a un tubo graduado de manera que el volumen final sea de 4 mL.
- La relación peso/volumen a obtener es de 25g de carne iniciales por mL de Tween 60 al 1%.

4.4.2. Bioensayo en ratón.

- Inocular por vía intraperitoneal 1 mL de la solución de diclorometano y metanol a tres ratones de 19-21 g de peso por cada extracto.
- Para el extracto de diclorometano mantener los ratones en observación al menos 24 horas, con comida y agua.
- Para el extracto metanólico mantener los ratones en observación al menos 6 horas, con comida y agua.

4.4.3. Interpretación de resultados.

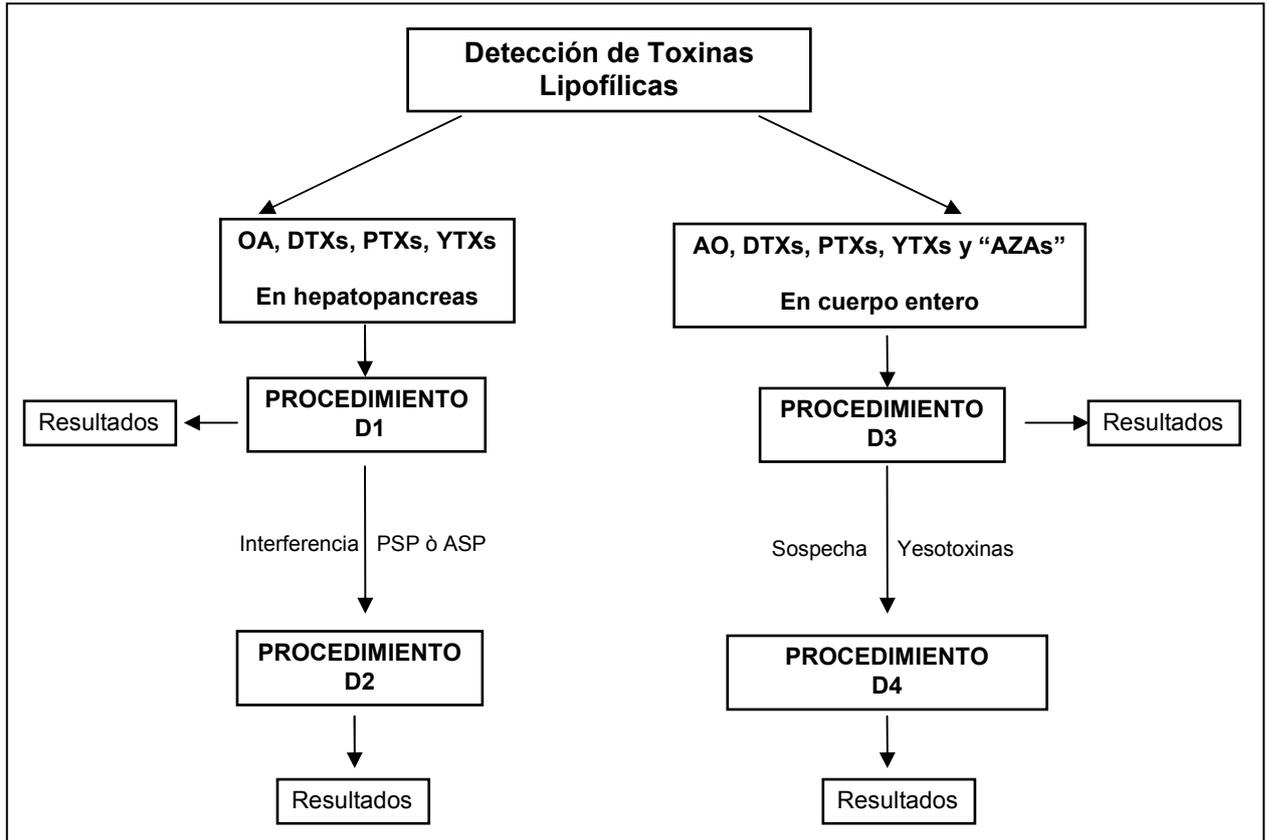
- Para el extracto de diclorometano, el bioensayo se considera como presencia cuando se produce la muerte de 2 de 3 ratones en 24 h y se interpreta como la presencia de una o más de las toxinas de los siguientes grupos: AO y DTXs, PTXs y AZAs a niveles por encima de los establecidos en el Reglamento (CE) nº 853/2004 .Cap V.
- Para el extracto metanólico, el bioensayo se considera positivo cuando se produce la muerte de 2 de 3 ratones en 24 h y se interpreta como la presencia de YTXs a niveles por encima de los establecidos en Reglamento (CE) nº 853/2004 .Cap V.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

5. ANEXOS:

Anexo I:

Diagrama Flujo para la detección de Toxinas Lipofílicas



Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

SECCIÓN III. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO DOMOICO (biotoxina ASP) EN MOLUSCOS BIVALVOS POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO (HPLC)

1. OBJETIVO

Detectar y cuantificar la cantidad de ácido domoico presente en muestras de moluscos bivalvos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

2. ALCANCE

Este procedimiento es aplicable a moluscos bivalvos, equinodermos, gasterópodos marinos y tunicados en estado fresco, congelado o procesado.

3. FUNDAMENTO

Se basa en la extracción de la toxina de las carnes homogeneizadas con una solución metanol-agua y analizadas por cromatografía líquida de alta resolución con detector arreglo de diodos.

4. REFERENCIAS

- Pérez Calderón, R. Centro Nacional de Alimentación y Nutrición. Instituto Nacional de Salud. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública: v.19 n.3. Lima 2002. Validación de la metodología para la determinación de ácido domoico (biotoxina ASP) en moluscos bivalvos por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).
- Fernández. M.L; Miguez, A; Cacho, E.; Martínez, A. Diogène, J & Yasumoto, T. 2002. En "Floraciones algales nocivas en el cono sur americano. Sar, Ferrerio & Reguera, editores. Instituto Español de Oceanografía, España: pg. 77-120.
- Quilliam M.A., Xie M, Hardstaff WR. Rapid extraction and cleanup for liquid chromatography determination of domoico acid in unsalted seafood. Journal of AOAC 1995; Vol 78, N°2: 543-54.
- Quilliam M.A. and Wright, J.L.C., "The amnesic shellfish poisoning mystery ", Analytical Chemistry. 61: 1053A-60A (1989).
- Reglamento (CE) 853/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 29 de abril de 2004. Por la que se establecen normas específicas de los alimentos de origen animal.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

5. EQUIPOS Y MATERIALES

- Homogeneizador eléctrico (licuadora)
- Balanza analítica.
- Centrífuga.
- Campana de flujo laminar.
- Vortex.
- Equipo de filtración para solventes y bomba de vacío.
- Equipo de ultrasonido (sonicador)
- Micro pipetas de 0,5-10, 10-100 y de 100-1000 ul.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC), marca Agilent Technologies, serie 1200 equipado con:
 - Inyector automático.
 - Bomba binaria o superior con sistema de desgasificación.
 - Horno para la termostatación de la columna.
 - Sistema de control de datos analíticos para cromatografía líquida: monitor, CPU, impresora y LEO Chemstation software versión 3.1.
 - Detector de arreglo de diodos, con rango de longitud de onda de 190-950 nm (DAD).
 - Columna cromatográfica: Fase reversa C - 18, Eclipse XDB, 5 um, 4.6x150 mm, Zorbax .
- Tamiz ó colador de acero inoxidable
- Papel secante.
- Pipetas volumétricas de 1, 6 y 10 mL.
- Vasos de precipitado de 50, 100 y 250 mL.
- Tubos de centrífuga de plástico de polipropileno de 50 mL.
- Viales con septas para inyector automático de 2mL.
- Jeringas de plástico desechables de 1-5 mL con dispositivo para filtración de muestras y estándares.
- Filtros de membrana Millipore Millex - GV de 0.22 um y 0.45 um, 3 cm. de diámetro, con sellos de plástico, para muestras y estándares.
- Membrana filtrante de nylon de 47 mm x 0.45um, para la fase móvil.
- Membrana filtrante de 47 mm x 0.45um, para agua desionizada.

6. REACTIVOS

- Agua desionizada ultra pura .
- Acetonitrilo, CH₃ CN grado HPLC, marca Merck.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

- Metanol grado HPLC, marca Merck.
- Ácido trifluoroacético, grado espectrofotométrico, marca Merck.
- Solución certificada de ácido domoico: NRC CRM-DA-d: 100 ug/mL (National Research Council, Canadá). Cada ampolla viene codificada con número de lote, fecha de expiración y debe ser almacenada en refrigeración a 4°C aproximadamente y en oscuridad. No congelar la solución.
- Patrones de trabajo: Se preparan soluciones comprendidas entre 0.12 - 30 ug/mL de ácido domoico a partir de la solución NRC CRM-DA-d de aproximadamente 100 ug/mL diluyendo con una mezcla de metanol: agua desionizada (50:50 v/v). Se procederá a hacer la preparación de los patrones y la construcción de la recta de calibración.
- Solución diluyente: Metanol : Agua desionizada (50:50 v/v)

7. PROCEDIMIENTO

7.1. PREPARACION DE LA MUESTRA:

- **DESCONGELAMIENTO:**
 - Al recibir una muestra congelada, esta se coloca en un recipiente bajo un ligero chorro de agua potable. Es importante evitar sumergir.
 - Este proceso se realiza por no más de 45 minutos.
- **MOLUSCOS BIVALVOS:**
 - Limpiar y enjuagar el exterior e interior de los moluscos con agua potable para retirar arena y otras impurezas.
 - Separar la carne de la concha dentro de un recipiente limpio y seco seccionando los músculos aductores y el tejido adherido a la charnela.
 - No utilizar calor ni anestésicos para abrir las conchas y tener cuidado de no dañar o cortar el cuerpo de los moluscos en esta etapa.
 - Acondicionar las carnes para permitir su drenado en un colador de acero inoxidable durante 5 minutos. Descartar el drenado.
 - Recoger 100-150 g aproximadamente de carne, pasarla por papel secante y proceder a su homogeneización.
- **MARISCOS EN CONSERVA:**
 - Se ha de conseguir la homogeneización de todo el contenido del envase (carne y líquido de gobierno). Triturar la carne y mezclar con el líquido de cobertura. En el caso de conservas con envases de gran capacidad

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

separar la carne y drenar durante 5 minutos, recolectando todo el líquido de gobierno.

- Determinar el peso de la carne y el volumen del líquido, a fin de poder combinar posteriormente porciones de cada fracción en cantidades proporcionales.
 - Recoger 100-150 g aproximadamente de carne pasarla por papel secante y proceder a su homogeneización.
- **HOMOGENEIZACION:**
- Licue las carnes en un homogeneizador eléctrico para luego colocarlas en bolsas Whirl-Pack. Cerrar herméticamente.
 - Se almacenan en el congelador.

7.2. EXTRACCIÓN:

- 1) Pesar exactamente 4 g de la muestra homogeneizada directamente en un tubo de centrifuga de plástico de polipropileno de 50 mL y adicionar 16 mL de la solución al 50%.
- 2) Homogeneizar la muestra en el vortex durante 5 minutos y luego centrifugar a 5000 r.p.m durante 15 minutos.
- 3) Filtrar entre 1-5 mL del sobrenadante a través de filtros desechables de membrana Millipore Millex-GV de 0.22 micras de porosidad y 3 cm. de diámetro, con sellos de plástico, ajustables a jeringas descartables de 1-5 mL. Este proceso de filtrado se hace dos veces como mínimo; se puede refrigerar la muestra obtenida del primer filtrado almacenándola aproximadamente a 4°C (evitando congelarla) por 1 día como máximo. El segundo y tercer filtrado se hace antes de inyectarlo en el HPLC.
- 4) Para la preparación del blanco de reactivos se pesan 4 g de agua desionizada y se sigue el procedimiento de extracción anteriormente descrito.

7.3. DETECCION Y CUANTIFICACION:

- Las muestras se analizan por HPLC utilizando fase reversa y detector con arreglo de diodos, la columna que se usa es la Zorbax Eclipse XDB - C18 analítica de 4.6X150mm, de 5µm.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

- Antes de comenzar a utilizar el equipo se purga cada uno de los canales con la fase móvil (previamente filtrada) por 15 minutos aproximadamente (para eliminar si es que hay presencia de burbujas).
- Para acondicionar la columna pasar también la fase móvil (previamente filtrada) a flujo 1mL/min por 30 minutos como mínimo en las condiciones de trabajo establecidas.

Colocar en el equipo las siguientes condiciones de trabajo:

Flujo de la fase móvil:	1.25 mL/min.
Fase móvil:	acetonitrilo: agua: ácido trifluoroacético (10:89.9 : 0,1, v/v)
Volumen de inyección :	20 ul.
Temperatura de la columna:	40 ± 2 °C.
Longitud de onda:	242 nm.
Longitud de referencia	360 nm
Tiempo de corrida	15 min

1. Inyectar soluciones patrón de ácido domoico dentro del rango 0.2 - 1.5 ug/mL. Inyectar los extractos de las muestras por duplicado, el área de cada inyección no debe variar más del 3% (respecto de la media). Este es el RSD o desviación estándar relativa. Intercalar patrones de ácido domoico entre muestras de la serie.
2. La integración de los picos cromatográficos se llevará a cabo por medio del software LEO Chemstation, versión 3.1.
3. La identificación del ácido domoico se realiza por comparación con el tiempo de retención (TR) de los patrones. La confirmación se efectuará mediante adición de patrón de ácido domoico a los extractos de muestras que presenten concentraciones de ácido domoico superiores a 0,99 mg/Kg AD/g de producto
5. Al finalizar el análisis la columna se guardará o almacenará previo lavado siguiendo el Método: Lavado Acetonitrilo.M.

8. CURVA DE CALIBRACION

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

Se sugiere trabajar con soluciones patrón entre 2 y 10 ug/mL. Se construye la curva de calibración haciendo pasar por el HPLC soluciones patrón de ácido domoico de aproximadamente 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 y 10,0 ug/mL.

9. CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

A partir de la recta de calibración se obtienen los ug/mL de ácido domoico presentes en el extracto de muestra. Para calcular la concentración de ácido domoico por gramo de muestra se usará la fórmula que aparece a continuación (teniendo en cuenta que la extracción se parte de 4 g de muestra que se llevan a un volumen de 20 mL (20000 ul)) y siendo d el factor de dilución del extracto de muestra si lo hubiera.

$$\text{Ácido Domoico (ug/g)} = \frac{\text{ug AD} + \text{AE/mL extracto} \times \text{Vol. Total extracto (mL)} \times d}{\text{Peso muestra (g)}}$$

El resultado se expresará como ug/g o mg/kg, con una cifra decimal como máximo. Los decimales restantes tienen que ser sustituidos por ceros, es decir, se redondea de acuerdo al siguiente criterio: si el segundo decimal empezando por la izquierda es 5 ó superior, se le añade una unidad al primer decimal.

Si el límite de cuantificación es de **2,97 mg/Kg** ug AD/g de carne entonces los resultados inferiores a 0,2 mg/Kg de carne (límite de cuantificación) se expresarán como < **2,97 mg/kg** de carne.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

CAPITULO III. ANÁLISIS QUÍMICOS

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

INDICE

SECCIÓN I. DETERMINACION DE PLOMO Y CADMIO

SECCIÓN II. DBO₅

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

SECCION I

ALCANCE: MOLUSCOS BIVALVOS

ENSAYO: DETERMINACION DE PLOMO Y CADMIO

1. PRINCIPIO DEL METODO:

La muestra es carbonizada y llevada a 450 °C hasta la degradación de la materia orgánica y luego se cuantifica por absorción atómica los elementos de Pb y Cd.

2. MATERIALES APARATOS Y REACTIVOS

- Balanza analítica*
- Cocinilla eléctrica.
- Campana extractora de gases.
- Equipo de absorción atómica
- Acetileno
- Horno Muffla*.
- Crisoles.
- Vasos de 25 o 50 mL
- Fiolas de 10 mL clase A.
- Micropipeta.
- Tubos de vidrio con tapa con volumen >10 mL.
- Agua desionizada.
- Acido clorhídrico (ClH) 33 a 36% para Análisis traza de Metales.
- Acido nítrico (HNO₃) 61 a 71% para Análisis Traza de Metales

Curvas estándar:

- Estándar de Plomo 1000 ppm
Solución de trabajo de 25 ppm para preparar: 0,08; 0,15; 0,30; 0,40 y 0,50 ppm de Pb en solución de 0,1N de ácido clorhídrico.
- Estándar de Cadmio 1000 ppm
Solución de trabajo de 20 ppm para preparar: 0,012; 0,05; 0,15; 0,30 y 0,50 ppm de Cd en solución de 0,1N de ácido clorhídrico.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

3. PROCEDIMIENTO

Preparación de material.

- El material de vidrio y el crisol debe estar lavado previamente de acuerdo con el siguiente procedimiento:
 - La primera vez que se usa se somete a lavado con ácido clorhídrico 10%.
 - Después de este lavado, y después de cada uso se somete a lavado con ácido nítrico 10%.
 - Se lava con abundante agua destilada y desionizada.
 - Se seca con aire, evitando que entren partículas que puedan contaminar.
 - Se guarda en un compartimiento aparte, para no mezclarlo con material de vidrio utilizado en otros análisis.

Análisis de la muestra.

- Pese cerca de 10 a 12g de muestra en un crisol, limpio y tarado (ver nota 1). Pesar una muestra adicional de aproximadamente 10 g y adicionarle 300 uL de la solución de trabajo de Pb y 250 uL de la solución de trabajo del Cd. (Ver nota 2)
- Llevar la muestra a una temperatura entre 90 a 100 °C en la estufa hasta sequedad de la muestra por 1 a 2 horas.
- Luego colocar los crisoles con muestra a la cocinilla (al inicio de baja intensidad de calor) por aproximadamente 1 hora luego se sube la intensidad de la hornilla hasta que no salga vapores.
- Lleve los crisoles a la mufla a la temperatura de $440^{\circ}\text{C} \pm 20^{\circ}\text{C}$ por 12 a 15 horas, luego enfriar .
- Si las cenizas estuvieran poco negras entonces agregar 1 mL de ácido nítrico al 50 %, secar en la hornilla dentro de la campana y volver a la mufla por 1 a 2 horas, hasta cenizas mas claras.
- Disolver las cenizas en un vaso con 10 mL de ácido clorhídrico al 0.1N, ayude la disolución con calor, enrase en una fiola de 10 mL, trasvase a un tubo de vidrio para su posterior lectura.

Lectura de la Absorbancia.

Las longitudes de onda son para el Pb 217,0 nm y para el Cd 228,8 nm

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

Antes de proceder a la lectura de las muestras realice la calibración: cada análisis comienza con un blanco de calibración (cal zero) (los reactivos tal como se añaden al patrón o muestra al realizar la lectura). Para ambos metales (Cd y Pb) su absorbancia ha de ser inferior a 0,004.

El equipo realiza automáticamente tres lecturas de absorbancia para cada concentración leída. El valor de R.S.D. máximo aceptado entre las tres lecturas es del 10% excluyendo los blancos.

Recuperación

En la muestra con adición de plomo y/o cadmio debería de encontrarse una recuperación entre 80 y 110%, considerando una adición de 0,5 veces el límite para moluscos bivalvos que sería de 0,75 y 0,5 ppm para el Pb y Cd respectivamente

Linealidad del equipo.

En la calibración del equipo se comprobará el ajuste de los datos experimentales a la ecuación de la recta mediante el coeficiente de correlación que debe ser superior a 0,99.

Adicionalmente, se comprobará que la pendiente de la recta se mantiene en el intervalo definido durante la validación, para asegurarnos de que el análisis se realiza en las condiciones adecuadas:

- Pendiente recta calibración de Cd entre los límites: 0,556 a 0,675
- Pendiente recta calibración de Pb entre los Límites 0,054 a 0,071

4. CALCULOS

Cálculo y expresión del resultado

La concentración de cada metal se calcula según la expresión:

$$\text{ppm} = \frac{\text{C}_{\text{disol}} \times V}{w}$$

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

Siendo:

ppm : Concentración del metal metal(Cd o Pb)en la muestra en ug/g

Crisol : Concentración del metal en la disolución en ug/mL

V : Volumen en ml, en que se encuentra la muestra una vez digerida (10mL)

W : Peso en gramos de la muestra inicial

En el espectrofotómetro de absorción atómica se obtiene la lectura directa de la concentración de metales en la disolución en ppm (ug/g).

5. REFERENCIA O NORMA

INF. VAL : METODO LABS-ITP-FQ-004 Y METODO LABS-ITP-FQ-007.Rev 0

AÑO : Aprobado Julio 2009

TÍTULO : DETERMINACION DE PLOMO Y CADMIO

Nota:

- (1) Pesar solo a una muestra por duplicado en cada corrida (serie de varias muestras).
- (2) Pesar la muestra con adición para evaluar la recuperación, esto se realizará una vez por corrida.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

SECCION II

ENSAYO: DEMANDA BIOQUIMICA DE OXIGENO (DBO5)

1. PRINCIPIO:

La determinación de la demanda bioquímica de oxígeno es una prueba empírica en la cual se emplean procedimientos estandarizados de laboratorio para determinar los requerimientos relativos de oxígeno de aguas de desecho, efluentes y aguas contaminadas. La prueba mide el oxígeno utilizado durante un periodo específico de incubación para la degradación bioquímica del material orgánico (demanda de carbono) y el oxígeno usado para oxidar el material inorgánico como sulfuros y hierro ferroso. También puede medir el oxígeno usado para oxidar las formas reducidas de nitrógeno a menos que su oxidación se prevenga por un inhibidor. Los procedimientos de siembra y dilución proveen un estimado de la DBO a pH 6.5 a 7.5.

El método consiste en llenar con muestra, hasta que rebalse, una botella para DBO del tamaño especificado e incubarla a la temperatura especificada por 5 días. El oxígeno disuelto se mide inicialmente y después de la incubación, y la DBO se calcula de la diferencia entre la demanda de oxígeno inicial y final.

El análisis de la muestra debe ser lo más pronto posible (hasta 2 horas después de la recolección), de lo contrario la muestra se debe almacenar a $\leq 4^{\circ}\text{C}$. Sin embargo, aún a bajas temperaturas, la muestra debe almacenarse lo menos posible (hasta 6 horas, en este caso se debe indicar el tiempo y temperatura de almacenamiento). Entibie las muestras refrigeradas hasta 20°C antes del análisis. Nunca trabaje con muestras que tengan más de 24 horas desde su colección.

La muestra es incubada 5 días a 20°C en presencia de un sistema biológico aclimatado. La comparación del contenido de oxígeno de la muestra al comienzo y al final de la incubación es la medida de DBO.

El método es aplicable a residuos domésticos crudos o tratados, agua industrial, y agua de residuos industriales. La siguiente clase de materiales ejerce demanda de oxígeno: (1) material orgánico utilizable como alimento por organismos aeróbicos (fuente de DBO para muchas aguas residuales); (2) nitrógeno oxidable de nitritos, NH_3 , y compuestos orgánicos nitrogenados los cuales sirven como alimento para bacterias específicas (por ejemplo: Nitrosomonas y Nitrobacter) (una fuente de algo de la demanda de oxígeno de efluentes tratados biológicamente); (3) materiales químicamente oxidables (por ejemplo: Fe^{+2} , S^{-2} , SO_3^{-2}) (cuando están presentes, la prueba debe basarse sobre el contenido de oxígeno disuelto inicial calculado).

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

Muchos componentes orgánicos sintéticos de residuos industriales no son degradados por organismos ordinarios. Sin el material de sembrado especial, el efecto es manifestado como el retardo del metabolismo aeróbico por el efecto tóxico o la deficiencia o ausencia del microorganismo apropiado. Los compuestos tóxicos en el agua destilada, frecuentemente Cu, pueden resultar en una baja DBO.

2. MATERIALES, APARATOS Y REACTIVOS:

- a) Botellas de incubación, 250 ó 300 mL. Lave las botellas con un detergente, enjuague cuidadosamente y seque antes de usarlas. Como medida de precaución contra la entrada de aire a la muestra, agregue agua a la boca de las botellas de DBO. Cubra la boca de las botellas con parafilm para reducir la evaporación del sello de agua durante la incubación.
- b) Incubadora o baño de agua, controlado termostáticamente a $20 \pm 1^\circ C$. Excluir toda luz para prevenir la posibilidad de producción fotosintética de Demanda de Oxígeno.
- c) Solución Buffer Fosfato, disolver 8.5 g KH_2PO_4 ; 21.75 g K_2HPO_4 ; 33.40 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ y 1.70 g NH_4Cl en aproximadamente 500 mL de agua destilada y diluir a 1 litro. El pH debe ser 7.2 sin ajuste. Descarte el reactivo si hay algún signo de crecimiento biológico en la botella de almacenamiento.
- d) Solución de sulfato de magnesio, disolver 22.5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ en agua destilada y diluir a 1 litro.
- e) Solución de cloruro de calcio, disolver 27.5 g de $CaCl_2$ en agua destilada y diluir a un litro.
- f) Solución de cloruro férrico, disolver 0.25 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ en agua destilada y diluir a un litro.
- g) Soluciones ácida y alcalina, 1N, para neutralización de muestras ácidas o cáusticas.
 - 1). Ácida, lentamente y mientras agita, agregue 28 mL de ácido sulfúrico concentrado sobre agua destilada. Diluya a un litro.
 - 2). Alcalina, disolver 40 g NaOH en agua destilada. Diluir a 1 Litro.
- h) Solución de sulfito de sodio, disolver 1.575 g Na_2SO_3 en 1 L de agua destilada. Esta solución no es estable. Preparar fresco según lo que se necesite.
- i) Inhibidor de nitrificación, 2-cloro-6-(triclorometil) piridina (opcional)
- j) Solución de glucosa-ácido glutámico, seque la glucosa y el ácido glutámico grado reactivo a $103^\circ C$ por 1 hora. Agregue 150 mg de glucosa y 150 mg de ácido glutámico a agua destilada y diluya a 1 litro. Prepare inmediatamente antes de usar.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

k) Solución de cloruro de amonio, disuelva 1.15 g de NH_4Cl en aproximadamente 500 mL de agua destilada, ajuste el pH a 7.2 con solución de NaOH , y diluya a 1 L. La solución contiene 0.3 mg N / mL.

3. PROCEDIMIENTO:

a) Preparación del agua de dilución:

Agregue un volumen deseado de agua a una botella adecuada y agregue 1 mL de soluciones de buffer fosfato, MgSO_4 , CaCl_2 y FeCl_3 por cada litro de agua inocule el agua de dilución, si lo desea, como se describe en 3 d. Pruebe y almacene el agua de dilución como se describe en 3 b y c para asegurar la calidad del agua.

Antes de usar lleve el agua de dilución a una temperatura de 20° C. Sature con oxígeno disuelto agitando en una botella parcialmente llena o aereando con aire filtrado libre de material orgánico. Alternativamente, almacene en botellas con tapón de algodón el suficiente tiempo como para saturar el agua de oxígeno. Proteja la calidad del agua usando material de vidrio, tuberías y botellas limpias.

b) Verificación del agua de dilución:

Use el siguiente procedimiento como verificación gruesa de la calidad del agua de dilución:

Si la disminución de un agua de dilución excede los 0.2 mg / L obtenga la adecuada mejorando su purificación o tomándola de otra fuente. Alternativamente, si se hace uso de la inhibición de nitrificación, almacene el agua de dilución, inoculada como se indica abajo, en un cuarto oscuro a temperatura ambiente hasta que la captura de oxígeno sea reducida lo suficiente para llegar al criterio de verificación del agua de dilución. Verifique la calidad del agua de dilución en uso almacenada, pero no agregue inculo al agua de dilución almacenada para mejorar la calidad. El almacenamiento no es recomendado cuando se va a determinar DBO_5 sin inhibición de la nitrificación porque los organismos nitrificantes se pueden desarrollar durante el almacenamiento. Verifique el agua de dilución almacenada para determinar si es que permanece el suficiente amoniaco después del almacenaje. Si no, agregue solución de cloruro de amonio para proveer un total de 0.45 mg de amoniaco / L como nitrógeno. Si el agua de dilución no ha sido almacenada para mejorar la calidad, agregue la suficiente cantidad de inculo para producir una cantidad de OD captado de 0.05 a 0.1 mg / L en 5 días a 20 ° C. Incube una botella de DBO llena de agua de dilución por 5 días a 20 ° C. Determine el OD inicial y final como en 3g y j. La captura de OD en 5 días a 20 ° C no debe ser mayor que 0.2 mg / L y preferiblemente no mayor a 0.1 mg / L.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

c) Verificación con glucosa-ácido glutámico:

Como la prueba de DBO es un bio - ensayo sus resultados pueden ser bastante influenciados por la presencia de tóxicos o por el uso de un material de siembra pobre. Las aguas destiladas están frecuentemente contaminadas por cobre; algunas cepas de alcantarilla son relativamente inactivas. Siempre se obtienen bajos resultados con esta clase de inóculos y aguas. Periódicamente verifique la calidad del agua de dilución, la efectividad de siembra, y la técnica analítica haciendo medidas de DBO en compuestos orgánicos puros y muestras con adiciones conocidas. En general, para determinaciones de DBO que no requieren una cepa adaptada, use una mezcla de 150 mg de glucosa / L y 150 mg de ácido glutámico / L como una solución estándar de verificación. La glucosa tiene un rango de oxidación excepcionalmente alto y variable pero cuando se usa con ácido glutámico, el rango de oxidación se estabiliza y es similar al obtenido con muchos desechos municipales. Alternativamente, si un agua de desecho en particular contiene un constituyente identificable mayor que contribuya a la DBO, use este compuesto en lugar de la glucosa-ácido glutámico.

Determine la DBO en 5 días y a 20 ° C de una dilución al 2% de la solución de verificación estándar de glucosa-ácido glutámico usando las técnicas señaladas en 3d-j.

d) Inoculo:

1) Fuente del inoculo. Es necesario tener presente una población de microorganismos capaz de oxidar la materia orgánica biodegradable en la muestra. Agua de desecho doméstica, no - clorada o efluentes no desinfectados de plantas de tratamiento biológico, y aguas superficiales que reciben descargas de aguas de desecho contienen la población microbiana satisfactoria. Algunas muestras no contienen una población microbiana suficiente (por ejemplo algunos desechos industriales no tratados, desechos desinfectantes, desechos a altas temperaturas, o desechos con valores de pH extremos). Para estos desechos inocule el agua de dilución agregando una población de microorganismos. El inoculo preferido es el efluente de un sistema de tratamiento biológico del procesamiento del desecho. Cuando esto no es disponible use el sobrenadante de aguas de desecho doméstico después de reposar a temperatura ambiente por lo menos 1 hora pero no más de 36 horas. Cuando el efluente de un proceso de tratamiento biológico es usado, se recomienda la inhibición de la nitrificación.

Algunas muestras pueden contener materiales que no se degradan en rangos normales por los microorganismos en el agua de desecho doméstico asentada. Inocule estas muestras con una población microbiana adaptada obtenida del efluente no desinfectado de un tratamiento biológico del

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

desecho. En ausencia de esta facilidad, obtenga el inóculo de agua receptora por debajo del punto de descarga (preferiblemente 3 a 8 Km.). Cuando este tipo de inóculo tampoco está disponible, desarrolle una semilla adaptada en el laboratorio aereando continuamente una muestra de agua de desecho doméstico y agregando pequeños incrementos de desecho diariamente. Opcionalmente use una suspensión de suelo o de lodo activado, o la preparación de una semilla comercial para obtener la población microbiana inicial. Determine la existencia de una población microbiana satisfactoria probando la actuación del inóculo en pruebas de DBO en la muestra. Valores de DBO que aumentan con el tiempo de adaptación a un alto valor estable indica una adaptación satisfactoria del inóculo.

- 2) Control del inóculo. Determine la DBO del material de inoculación como para cualquier otra muestra. Esto es el control del inóculo. Del valor del control del inóculo y el conocimiento de la dilución del material de inoculación (en el agua de dilución) determine la captación del OD por el inóculo. Idealmente efectúe diluciones del inóculo de modo que la cantidad más alta resulte por lo menos en el 50% de disminución del OD. Un gráfico de la disminución de OD, en miligramos por litro, versus los mililitros inoculados deben presentar una línea recta en la cual la pendiente indique la disminución del OD por mililitro de inóculo. El intercepto del eje de OD es la disminución de oxígeno causada por el agua de dilución y debe ser menor a 0.1 mg / L (3h). Para determinar el OD captado reste la captura de OD del inóculo de la captura total de OD. La captura de OD del agua de dilución inoculada debe estar entre 0.6 y 1.0 mg / L.

Se describen técnicas para agregar inóculo al agua de dilución para dos métodos de dilución de muestra. (3f)

e) Pre tratamiento de Muestras:

Mantenga el tiempo entre la colección de la muestra y el inicio del análisis el mínimo absoluto. Proteja las muestras del oxígeno atmosférico.

- 1) Muestras con alcalinidad cáustica o acidez.- Neutralice a pH 6.5-7.5 con una solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄) o hidróxido de sodio (NaOH) de tal fuerza que la cantidad de reactivo no diluya la muestra más del 0.5%. El pH del agua de dilución inoculada no debe ser afectado por la menor dilución de la muestra.
- 2) Muestras conteniendo compuestos de cloro residual.- Si es posible, evite muestra que contengan cloro residual muestreando antes del proceso de cloración. Si la muestra ha sido clorada pero el cloro residual presente no es detectable, inocule la muestra. Si el cloro residual está presente, retire el cloro de la muestra e inocule el agua de dilución (4 f). No pruebe

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

las muestra cloradas o de - cloradas sin inocular el agua de dilución. En algunas muestras el cloro se disipa en 1 o 2 horas de reposo en la luz. Esto frecuentemente ocurre durante el transporte y manejo. Para muestras en las cuales el cloro residual no se disipa en un corto tiempo razonable, destruya el cloro residual agregando una solución de Na₂SO₃. Determine el volumen requerido de solución de Na₂SO₃ en una porción de 100-1000 mL de muestra neutralizada añadiendo 10 mL HOAc (1+1) o H₂SO₄ (1+50) y 10 mL de solución de KI al 10% por 1000 mL de muestra y titulando con una solución de Na₂SO₃ al punto final I - almidón. Agregue el volumen de Na₂SO₃ indicado a la muestra según lo determinado con la prueba anterior y luego de 10-20 minutos verifique el cloro residual. (NOTA: Un exceso de Na₂SO₃ ejerce una demanda de oxígeno y reacciona lentamente con algunos compuestos orgánicos clorados que pueden estar presentes en muestras cloradas.)

- 3) Muestras que contienen otras sustancias tóxicas.- Remueva o neutralice. Pruebe la toxicidad como sigue: Agregue la misma cantidad de siembra para un set de duplicados de botellas de DBO. Agregue agua de dilución a cada botella, dejando espacio para cantidades de muestra que den concentraciones finales de 0.06, 0.12, 0.25, 0.50, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 20, y 40 %. Neutralice la muestra, agregue el volumen requerido de muestra a las botellas por duplicado y llene con agua de dilución. Determine el oxígeno disuelto en la 1° serie aproximadamente 15 minutos después de la preparación de las diluciones. Determine el oxígeno disuelto en la segunda serie después de 3 días. Trace el consumo de oxígeno disuelto contra concentración. La magnitud del cambio de concentración de oxígeno dependerá de la cantidad de alimento disponible y toxicidad de la muestra. Si la toxicidad es un factor, el consumo de O descenderá en concentraciones altas. Fuente: AOAC 973.44 1990
- 4) Muestra supersaturadas con oxígeno disuelto.- Muestras que contengan >9.2 mg de oxígeno / L a 20° pueden ser encontradas en aguas frías o en aguas donde ocurre la fotosíntesis. Para prevenir la pérdida de oxígeno durante la incubación de esta tipo de muestras, reduzca el contenido de oxígeno a la saturación transfiriendo la muestra a 20° a una botella parcialmente llena y agite vigorosamente o aeree con aire filtrado comprimido.
- 5) Ajuste de temperatura de la muestra.- Lleve las muestras a 20 ± 1° C antes de preparar las diluciones.
- 6) Inhibición de nitrificación.- Si se desea inhibir la nitrificación agregue 3 mg de 2-cloro-6(triclorometil)piridina (TCMP) a cada botella de 300 mL antes de tajarla o agregue las cantidades suficientes al agua de dilución para hacer una concentración final de 10 mg / L. (NOTA: El TCMP puro

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

puede disolverse lentamente y flotar en la superficie de la muestra. Algunas formulaciones comerciales disuelven más rápidamente pero no son 100% TCMP; ajuste la dosis correspondiente.) Las muestras que pueden requerir inhibición de la nitrificación incluyen, pero no se limitan a, efluentes tratados biológicamente, muestras inoculadas con efluentes tratados biológicamente y aguas de río. Anote el uso de inhibición de nitrógeno al reportar los resultados.

f) Técnica de dilución:

Las diluciones que resultan con oxígeno disuelto residual de por lo menos 1 mg / L y un OD y una captación de OD de por lo menos 2 mg / L después de 5 días de incubación producen los resultados más confiables. Efectúe varias diluciones de la muestra preparada para obtener una captación de OD en este rango. La experiencia con una muestra particular permitirá usar un menor número de diluciones. Un análisis más rápido, como DQO, puede ser correlacionado aproximadamente con la DBO y servir como guía en seleccionar diluciones. En la ausencia de conocimiento preliminar emplee las siguientes diluciones: 0.0 a 1.0% para desechos industriales fuertes, 1 a 5% para agua de desecho cruda y asentada, 5 a 25% para efluente biológicamente tratado, y 25 a 100% para aguas de río contaminado.

Prepare diluciones ya sea en cilindros graduados y luego transfíralos a botellas de DBO o prepare las diluciones directamente en botellas de DBO. Cualquier método de dilución se puede combinar con cualquier técnica de medida de OD. El número de botellas a ser preparadas para cada dilución depende de la técnica de OD y el número de repeticiones deseadas.

Cuando use cilindros graduados para preparar las diluciones, y cuando el inóculo es necesario, agregue el inóculo directamente al agua de dilución o a los cilindros individuales antes de la dilución. Inocular cilindros individuales previene un rango declinante del inóculo en la muestra mientras se efectúan más diluciones. Cuando las diluciones son preparadas directamente en las botellas de DBO y cuando el inóculo es necesario, agregue el inóculo directamente al agua de dilución o directamente a las botellas de DBO.

1) Diluciones preparadas en cilindros graduados- Si se emplea la modificación de azida en el método iodométrico titrimétrico (4500-O.C), sifonee cuidadosamente agua de dilución, inoculada si es necesario, en un cilindro graduado de 1 a 2 Litros de capacidad. Llene la mitad del cilindro sin la entrada de aire. Agregue la cantidad deseada de muestra cuidadosamente mezclada y diluya al nivel apropiado con agua de dilución. Mezcle bien con una varilla de mezcla tipo embolo; evite la entrada de aire. Sifonee la dilución mezclada en 2 botellas de DBO. Determine el OD inicial en una de estas botellas. Tape la segunda botella fuertemente, sellada con agua, e incube por 5 días a 20 ° C. Si se emplea el método del

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

electrodo de membrana para la medición del OD, sifonee la mezcla de dilución en una botella de DBO. Determine el OD en esta botella y remplace cualquier volumen desplazado con dilución de la muestra para llenar la botella. Tape fuertemente, sellada con agua, e incube por 5 días a 20 ° C.

- 2) Diluciones preparadas directamente en las botellas de DBO- Usando una pipeta volumétrica de boca ancha, agregue el volumen de muestra deseada a botellas individuales de DBO de capacidad conocida. Agregue las cantidades apropiadas de material de siembra a las botellas individuales de DBO o al agua de dilución. Llene las botellas con la suficiente agua de dilución, sembrada si es necesario, de modo que la inserción de la tapa desplace todo el aire, no dejando burbujas. Para diluciones mayores a 1:100 efectúe una primera dilución en un cilindro graduado antes de hacer la dilución final en la botella. Cuando use métodos iodométricos titrimétricos para la medida de OD, prepare dos botellas para cada dilución. Determine el OD inicial en una botella. Tape la segunda botella fuertemente, selle con agua, e incube por 5 días a 20 ° C. Si se emplea el método del electrodo de membrana para la medición del OD, prepare solamente una botella de DBO para cada dilución. Determine el OD inicial en esta botella y remplace cualquier volumen desplazado con agua de dilución para llenar la botella. Tape fuertemente, selle con agua, e incube por 5 días a 20 ° C. Enjuague el electrodo de OD entre determinaciones para prevenir la contaminación cruzada de las muestras.

g) Determinación del OD inicial:

Si la muestra contiene material que reacciona rápidamente con el OD, determine el OD inicial inmediatamente después de llenar la botella de DBO con muestra diluída. Si el OD inicial inmediato captado es insignificante, el periodo entre la preparación de la dilución y la medida inicial de OD no es crítico.

Emplee la modificación de azida en el método iodométrico titrimétrico (4500-O.C) o el método de electrodo de membrana (4500-O.G) para determinar el OD inicial en todas las diluciones de la muestra, blancos de agua de dilución, y cuando sea apropiado, controles de inóculo.

h) Blanco del agua de dilución:

Use un blanco de agua de dilución como una verificación gruesa de la calidad del agua de dilución no sembrada y de la limpieza de las botellas de incubación. Junto con cada batch de muestras incube una botella de agua de dilución sin sembrar. Determine el OD inicial y final como en 3 g y 3 j. El OD captado no debe ser más de 0.2 mg / L y preferiblemente no mayor a 0.1 mg / L.

i) Incubación:

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

Incube a $20^{\circ} C \pm 1^{\circ} C$ las botellas de DBO conteniendo las diluciones deseadas, controles de siembra, blancos de agua de dilución, y las verificaciones con glucosa - ácido glutámico. Las botellas son selladas con agua como se describe en 3 f.

j) Determinación del OD final:

Después de 5 días de incubación determine el OD en las diluciones de la muestra, los blancos, y las verificaciones como en 3 g.

4. CALCULOS:

Cuando el agua de dilución no ha sido inoculada:

$$DBO_5, \text{ mg/L} = \frac{D1 - D2}{P}$$

Cuando el agua de dilución ha sido inoculada:

$$DBO_5, \text{ mg/L} = \frac{(D1 - D2) - (B1 - B2) f}{P}$$

Donde:

D1 = OD en la muestra diluida inmediatamente después de la preparación, mg / L

D2 = OD de la muestra diluida después de 5 días de incubación a $20^{\circ} C$, mg / L

P = fracción volumétrica decimal de muestra usada

B1 = OD del control del inculo antes de la incubación, mg / L (4d)

B2 = OD del control del inculo después de la incubación, mg / L (4d)

f = rango de inculo en la muestra diluida a inculo en el control del inculo
= (% de inculo en la muestra diluida) / (% de inculo en el control del inculo)

Si el inculo es agregado directamente a las botellas de muestra o de control del inculo:

f = (volumen de inculo en la muestra diluida) / (volumen de inculo en el control del inculo)

Reporte los resultados como DBO₅ si la nitrificación es inhibida.

Si más de una dilución de la muestra concuerda con el criterio de un OD residual de por lo menos 1 mg / L y la disminución de OD es de por lo menos 2 mg / L y no hay evidencia de toxicidad en altas concentraciones o la existencia de una anomalía obvia, promedie los resultados en el rango aceptable.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

En estos cálculos, no efectúe correcciones debidas al consumo de oxígeno en el blanco del agua de dilución durante el periodo de incubación. Esta corrección es innecesaria si el agua de dilución cumple con el criterio estipulado arriba. Si el agua de dilución no concuerda con este criterio, las correcciones debidas son difíciles y los resultados se tornan cuestionables.

5. REFERENCIA.

APHA - AWWA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th Edition 1992.

5210 B. 5-Day DBO Test

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

CAPITULO IV. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO Y ENSAYO DE FITOPLANCTON POTENCIALMENTE TOXICO

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

SECCIÓN I. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO Y ENSAYO DE FITOPLANCTON POTENCIALMENTE TOXICO

1. OBJETIVO

Establecer las pautas secuenciales a considerar tanto durante el muestreo como en el ensayo semicuantitativo y cuantitativo del fitoplancton con especial énfasis a las especies potencialmente tóxicas que aseguren resultados confiables y comparables.

2. ALCANCE

El método es específico para la determinación de la composición, concentración celular y abundancia relativa de las especies potencialmente tóxicas del medio marino en el mar peruano. Entre las diatomeas se tiene a: *Pseudo-nitzschia pungens*, *Pseudo-nitzschia cf. delicatissima* y dinoflagelados como *Alexandrium minutum*, *Dinophysis caudata*, *Dinophysis acuminata*, *Dinophysis tripos*, *Dinophysis rotundata*, *Lyngulodinium polyedra*, *Prorocentrum minimum*, *Prorocentrum cf. balticum*, *Prorocentrum lima*, *Protoperidinium crassipes* y *Protoperidinium depressum*.

3. RESPONSABILIDADES

El jefe de laboratorio es responsable de supervisar el cumplimiento del presente instructivo de muestreo y ensayo de fitoplancton a nivel semicuantitativo y cuantitativo.

Los analistas y técnicos del laboratorio especializados son responsables de cumplir con lo establecido en el presente documento.

4. DEFINICIONES

Plancton:

Proviene del griego que significa vagar, flotar, se incluye a dos grupos el fitoplancton y zooplancton. Muchas de las especies del plancton son de dimensiones microscópicas y de un comportamiento pasivo como es el caso del fitoplancton.

Fitoplancton:

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

Es la parte vegetal del plancton, organismos con escaso o nulo poder de desplazamiento, como fotoautotróficos en su mayoría y corresponden al primer eslabón de la malla trófica de los océanos: productores primarios.

5. MATERIALES Y EQUIPOS

5.1 Muestreo con Red para el ensayo semicuantitativo

5.1.1 Materiales de muestreo

- Embarcación o bote.
- Red estándar de fitoplancton con malla de 10 micras y consta de:
 - Un aro de bronce con un diámetro interno de 13,5 cm. El aro tiene tres orificios que sirven para amarrar cabos de $\frac{1}{4}$ " de diámetro y 150 cm de largo.
 - Una manga de lona gruesa de 12 cm de largo que une el aro de bronce con la malla nylal.
 - Una sección de malla nylal de 60 cm de largo, con una abertura de poro de 10 μ m.
 - Una sección de tela elástica entre 05 y 10 cm, que conecta la malla nylal con el frasco colector. El volumen de este frasco puede variar desde 100 a 200 mL. Esta sección debe estar diseñada de forma tal que no existan fugas para no obtener información sesgada
 - Un lastre (que va sujeto al extremo inferior a la red que permite su hundimiento 1,0 kg aproximadamente). La abertura de la malla nylal debe ser de 10 μ m.
 - Termómetro de superficie de mercurio (Hg) calibrado, con escala de 1/10°C y de -2 a 35°C y protector de PVC.
 - Frasco (colector) de vidrio o plástico de 200 mL transparente de boca ancha con tapa rosca
 - Placas petri de 5cc de diámetro y 1,5 cm alto
 - Formaldehído al 20%
 - Lugol acético

5.1.2 Equipos para el ensayo semicuantitativo

- Microscopio estereoscopio
Aumento de 8X a 63X, Ocular de 10X/22

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

Cuerpo de aumento o zoom paralelo o galileo de 6,3X

Fuente de alimentación automática para 110 - 220 V

- Microscopio compuesto
- Oculares de 10X o 15X
- Objetivos de 4X, 10X, 40X y 100X.
- Ocular micrométrico y lámina patrón
- Aditamento de contraste de fases

5.2 Muestreo con Botella Niskin para el ensayo cuantitativo

5.2.1 Materiales de muestreo

- Botella Niskin de PVC y 5L de capacidad, con un sistema de cierre por mensajero, el cual cierra y hace hermética la botella. En el extremo inferior va sujeto a un lastre de 10 kg aproximadamente.
- Termómetro de inversión de Mercurio (Hg) calibrado, con escala de 1/10°C y de -2 a 35°C.
- Termómetro de superficie de Mercurio (Hg) calibrado, con escala de 1/10°C y de -2 a 35°C y protector de PVC. Con certificado de calibración.
- Frascos de 80 ó 100 mL de color ámbar, de vidrio, con tapa rosca.
- Frascos de 30 mL boca ancha, de plástico (para contramuestras).
- Formalina neutralizada al 20%
- Lugol-acético
- Etiquetas de papel canson

5.2.2 Equipos para el ensayo cuantitativo

- Microscopio invertido
- Objetivos de 10X, 20X y 40X (Objetivos PLAN). El objetivo de 40X con contraste de fases.
- Oculares iguales o mayores a 12,5X.
- Kit de contraste de fases.
- Reglilla ocular micrométrica.
- Platina mecánica con botones de mando para lectura transversal y longitudinal (X,Y), vernier y nomio (lectura 0,1 mm).
- Microscopio compuesto (características similares al ítem 5.1.2).
- Cámaras de sedimentación con cilindros o columnas de 25 ó 50 cc.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

5.3 Muestreo con manguera (Lindahl, 1986) para el ensayo cuantitativo

5.3.1 Material de muestreo

- La manguera es de plástico, transparente, con un diámetro externo de 2,8 cm y de 2,3 cm de diámetro interno y longitud de 20 m como máximo.
- Esta dividida en secciones de 5m, de acuerdo a los estratos o profundidad a la que se quiere hacer el muestreo (sí la profundidad es de 10m la longitud del muestreador no debe ser menor de esta profundidad).
- Cada sección esta dividida con una llave de compuerta, las cuales se enlazan a través de una unión de rosca, siendo cada una de ellas independiente y desmontable entre sí.
- En la parte terminal de la manguera se acopla un lastre de aproximadamente de 2 kg. para darle estabilidad.
- Recipientes de plástico de 2 a 5 L.
- Frascos de 80 ó 100 mL de color ámbar, de vidrio con tapa rosca.

5.4. Reactivos y preparación de soluciones preservantes

Formaldehido

Para su preparación se necesita: 1 L de formaldehído P.A.(al 37%, estabilizado con metanol al 10%, grado de acidez (HCOOH) no mayor de 0,025%), se le agrega 1 L de agua destilada y 1,2 g de carbonato de sodio hidrogenado PA (NaHCO₃), para neutralizar la solución. Se usa cintas indicadoras del pH para verificar el valor de 7.0 en la solución final.

Lugol-acético

20g de Ioduro de potasio, 10g de I₂, se agrega 200ml de agua destilada y 20g ácido acético.

6. ASPECTOS A CONSIDERAR PARA EL MUESTREO

- Contar con una ficha de datos de campo en donde se registra la siguiente información: Zona, área, estación y/o punto de muestreo; fecha y hora de muestreo (inicio y término); profundidad de muestreo; tipo de muestra (semicuantitativa o cuantitativa); nombre del responsable; parámetros ambientales (temperatura superficial y de fondo, oxígeno, pH y salinidad).

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	---	--

- Verificar las condiciones de la red y del frasco colector que este bien asegurado. Se recomienda que la unión del frasco colector con la red sea mediante un sistema de rosca hermético, si no fuera así, amarrar con un hilo resistente (pita de cáñamo) la unión de la tela elástica o lona con el frasco.
- Considerar que el lastre que va unido a la red debe estar a una altura determinada (aproximadamente 50cm) del fondo, cuidando de no crear turbulencia y dificulte el muestreo.
- Evitar que la red este en contacto con grasas y aceite (sí se ensuciara con éstos, hay que lavarla con agua tibia y detergente).
- Los pequeños agujeros en la malla nylal pueden ser reparados temporalmente con cemento liquido, parafina, cera de abeja, etc. y los grandes deben ser parchados con un pedazo de la misma malla e hilo fino.
- Se recomienda que el horario de muestreo este en función de horas luz de preferencia por la mañana o tarde.
- Dependiendo de la especies halladas en las muestras, estas serán tratadas adecuadamente, esto es: tratamiento previo de limpieza, separación de placas, coloración u otro método que facilite su observación e identificación.

7. DESCRIPCION DEL MUESTREO

7.1 Muestreo con red para el ensayo semicuantitativo

- Introducir la red en forma vertical hasta una profundidad aproximada a 50 cm del fondo, teniendo cuidado que no forme alguna burbuja de aire.
- Mantenerla unos segundos en el punto de muestreo y empezar el izado a una velocidad de 1m/s. Esta operación se repite como mínimo tres veces en el mismo lugar.
- Con la red en cubierta se procede a trasvasar el filtrado obtenido en el frasco o recipiente colector a otro de igual o mayor capacidad, teniendo en cuenta rotular dicho recipiente con la información indicada en el ítem 6.
- Para su preservación se agrega 10 mL de formaldehido neutralizado al 20%.
- Posterior a la operación anterior se homogeniza convenientemente la muestra.
- Lavar la red con agua de mar, preparándola para la siguiente estación.
- Al concluirse el monitoreo y ya en el laboratorio, se lava la red con agua dulce y secar a temperatura ambiente.

7.2 Muestreo con botella Niskin para el ensayo cuantitativo

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

- Bajar la botella Niskin a dos o tres niveles (superficie media agua y fondo) según la profundidad deseada teniendo como señal los marcajes de profundidad de la línea madre o por un contador.
- Esperar por lo menos 1' para enviar el mensajero, luego de unos segundos se iza la botella a la superficie y/o cubierta de la embarcación.
- Registrar los datos de temperatura que indica el termómetro de inversión de la botella Niskin.
- El orden para la toma de la muestra de fitoplancton es el último.
- Se toma una sub muestra en frascos de 80 ó 100 mL, para ello se abre el tapón de respiración y la válvula de escape de la botella Niskin através de una manguera de (jebe, latex, silicona o PVC), en la parte inferior del muestreador, la cual se introduce dentro del frasco para obtener la muestra.
- Agregar 2 mL de formaldehido (Thróndsen, 1978) a la muestra, un buen indicador de la presencia en concentración suficiente de formol es el olor, el cual delata su presencia a la sola exposición del olfato.
- Puede también fijarse con la solución de lugol-acético, agregándose 3 gotas a la muestra o hasta que ésta adquiera el color del whisky.
- Rotular cada frasco con la información necesaria según el ítem 6.

7.3 Muestreo con manguera (Lindahl, 1986) para el ensayo cuantitativo

- Acondicionar la longitud de la manguera conforme a lo establecido en el ítem 5.3.
- Debe establecerse en los primeros 5m el área libre de muestreo, esto se refiere a la separación entre la superficie del mar y la altura de la embarcación o punto de ejecución del muestreo.
- Cerciorarse del buen funcionamiento de las llaves (apertura y cierre) del muestreador y el fácil enrosque y desenrosque de las secciones.
- Bajar el muestreador guardando la verticalidad de este, asegurándose que las llaves estén abiertas.
- Bajar el muestreador a una velocidad tal que el llenado de este sea uniforme y sin turbulencia (1m/s).
- Llegado a la profundidad requerida se cierra la llave superior y se procede a izarla.
- Sucesivamente conforme se va izando el muestreador, también se van cerrando las llaves de las subsiguientes secciones.
- Con el muestreador en cubierta se procede a trasvasar el contenido de cada sección en recipientes (2 a 5 L), previamente rotulados, tal es así que a cada

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

recipiente le corresponderá una sección; así a la sección de 0 - 5 m, le corresponderá los recipientes 0 - 5 m y así sucesivamente.

- De cada recipiente se toma una sub muestra (80 ó 100 mL) y se procede a fijarla con las soluciones de lugol-acético o formaldehido, según indicaciones en el ítem 7,2
- Posterior a la operación anterior se debe de homogenizar convenientemente la muestra.
- Rotular cada recipiente con la información necesaria del punto de muestreo.

7.4 Muestreo con red en orilla para el ensayo semicuantitativo

- Se emplea un balde de 10 L y una red (10µm).
- Dos personas deben ingresar al mar con los materiales de muestreo hasta una distancia prudente en la que puedan trabajar.
- Deben esperar que la ola reviente y al cabo de algunos segundos en el punto de muestreo se procede a coleccionar la muestra.
- Se colecciona un total de 50L de agua de mar, los cuales son filtrados en la red.
- Sí el contenido tuviese arena, sedimento o material particulado en abundancia, se espera unos minutos hasta que sedimente y proceder al filtrado.
- El procedimiento de trasvasado, rotulado y preservación de la muestra es detallado en el ítem 7.1 y 6.0.

8. PROCEDIMIENTOS PARA EL ENSAYO SEMICUANTITATIVO Y CUANTITATIVO DE FITOPLANCTON

8.1 Ensayo semicuantitativo

- Tomar una submuestras de 3mL, aproximadamente 40 gotas con pipeta Pasteur y se coloca en una placa de petri.
- Se lleva al microscopio estereoscopio para su lectura e identificación con un aumento de 6,3X. Este proceso se repite 3 veces para llegar a determinar a la totalidad de especies presentes.
- Anotar todas las especies identificadas elaborando un listado de acuerdo a la escala de la abundancia relativa según metodología reportada por Rojas de Mendiola et al. 1985 en:

4 : Muy abundante (mayor de 25 cel/c)

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

- 3 : Abundante (entre 16 y 25 cel/c)
 2 : Escaso (entre 6 y 15 cel/c)
 1 : Presente (entre 1 y 5 cel/c)
 0 : Ausente

cel/c= células por campo

- Las especies de difícil determinación se separan para un previo tratamiento de limpieza, separación de placas, coloración u otro método, para ser observadas en el microscopio compuesto, el aumento empleado es de 40X ó 100X.
- Reportar los resultados en el formato F1A: "Ficha de ensayo semicuantitativo", en donde se registra la ocurrencia y abundancia relativa de las especies potencialmente toxigénicas y de las especies acompañantes. Se determina el porcentaje de predominancia de los grupos del plancton: fitoplancton y zooplancton en cada estación de muestreo.

8.2 Ensayo cuantitativo

- Concentrar la muestra mediante la sedimentación según el método de Utermöhl, para lo cual se homogeniza la muestra (con movimientos rotatorios verticales y horizontales, cuidando de no destruir cadenas o colonias) y verter el contenido en columnas o cilindros de sedimentación de 25 ó 50 cc, para luego tapar en la parte superior.
- El cilindro de 50cc tiene un tiempo de sedimentación promedio de 24 horas y el cilindro de 25cc es de 12 horas hasta su lectura.
- No se recomienda el uso de columnas de 100 mL, debido a la adherencia de planctontes a las paredes, así como la formación de corrientes de convección, impidiendo la sedimentación.
- Cumplido el tiempo de sedimentación se separa la columna de la platina, la cual posee un orificio que facilita el drenaje del agua de la columna. Esta columna es retirada hacia el extremo donde está el orificio utilizando una lámina cuadrada de vidrio.
- Evitar la formación de burbujas y el incremento de temperaturas en el ambiente de análisis. Se recomienda mantener condiciones controladas de temperatura en zonas cálidas.
- Se procede a la lectura de la cámara, esta fase se realiza utilizando un microscopio invertido.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

8.2.1 Lectura de las muestras

La importancia fundamental de la aplicación de este procedimiento, es que está dirigido a determinar y cuantificar (cel. L-1) la presencia de fitoplancton potencialmente toxigénico.

- La determinación se realizará utilizando las claves respectivas.
- La lectura se realiza mediante observación directa con microscopio invertido a 160 X, 200X ó 400X de aumento.
- Las células menores de 50 μm y las más abundantes, serán contadas en un área que represente 1 ml de la muestra con un aumento de 400X.
- Las células mayores de 50 μm y las especies potencialmente tóxicas serán contadas en mitad de área de la cámara con un aumento de 200X ó 160 X.
- Se completa el contaje leyendo toda la cámara para aquellos organismos que no se registraron en la mitad contada.
- Se realizan los cálculos: Sí el volumen es de 50 mL, los organismos contados al aumento de 400X, son multiplicados por 50 y luego por 20.
- Los organismos contados en la media base, se multiplican por 40 y los contados en toda la base sólo por 20.
- Los resultados son expresados en N° cel.L-1.
- Reportar los resultados en el formato F2A: "Ficha de Análisis Cuantitativo", indicando las especies toxigénicas presentes y la densidad por especie (cel.L-1).

9. ALMACENAMIENTO DE LA CONTRAMUESTRA

La contramuestra (semicuantitativo y cuantitativo) es concentrada y guardada en frasco de 30mL para ser almacenadas por un lapso no menor de 2 años, como respaldo ante cualquier eventualidad que se presente con los resultados alcanzados.

10. REFERENCIAS

- Balech E. 1988. Los dinoflagelados del Atlántico Sudoccidental. Public. Espec. Inst. Español de Oceanog. España. 310 pp.
- Cupp E. 1943. Marine plankton diatoms of the west coast of North America. Bull. Scripps Inst. Oceanogr. 5: 1-237.
- Grasshoff K, Kremling K, Ehrhardt M. 1999. Method of Sea Water Análisis. Ministerio de Medio Ambiente - España (2005). Protocolos para muestreo y análisis de fitoplancton.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

- Hasle G, Syvertsen E. 1996. Marine diatoms. In: Tomas C. (ed.). *Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates*. Academic Press, Inc. San Diego. 1-383 pp.
- Heimdal B. 1993. Modern Coccolithophorids. In Tomas C. (ed.). *Marine Phytoplankton a guide to naked flagellates and coccolithophorids*, Cap. 3. Academic Press, Inc. San Diego. 147-235 pp.
- Hendey I. 1964. An introductory account of the smaller algae of British Coastal waters. Part. V. Bacillariophyceae (Diatoms). Her Majesty's Stationery Office, London: 317 pp.
- Hustedt F. 1930. Die Kieselalgen Deutschlands, Osterreichs und der Schweiz mit Berücksichtigung der übrigen Länder Europas sowie der angrenzenden Meeresgebiete. En: L. Rabenhorst (ed). *Kryptogamen-Flora von Deutschland, Osterreich und der Schweiz*. 1 Teil. Akat. Verlagsges. Leipzig, Reprint Johnson Rep. Goop, New York 1971 1971: 920 pp.
- Rojas de Mendiola B, Gómez O, Ochoa N. 1985. Efectos del Fenómeno El Niño sobre el fitoplancton. En: El Niño. Su impacto en la fauna marina. Arntz., W., A. Landa y J. Tarazona (eds). *Bol. Extraord. Inst Mar Perú*: 33-40.
- Schiller J. 1971. a. Dinoflagellate (peridinae) in monographischer Behandlung. 2 Teil. En: L. Rabenhorst (ed). *Kryptogamen-Flora von Deutschland, Osterreich und der Schweiz*. Reprint by Johnson Repr. Corp. New York, 1971, Vol. 10 Section 3, Parte 1: 617 pp.
- Schiller J. 1971. b. Dinoflagellate (peridinae) in monographischer Behandlung. 2 Teil. En: L. Rabenhorst (ed). *Kryptogamen-Flora von Deutschland, Osterreich und der Schweiz*. Reprint by Johnson Repr. Corp. New York, 1971, Vol. 10 Section 3, Parte 2: 589 pp.
- Sournia A. 1967. Le genre *Ceratium* (Peridiniens Planctonique) dans le Canal de Mozambique. Contribution a une revision mondiale. *Vie et Milieu*. 18 (2^a-A): 375-580 pp.
- Steidinger K, Tangen K. 1996. Dinoflagellates. In: Tomas C. (ed.). *Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates*. Academic Press, Inc. San Diego. 387-570pp.
- Sundström B. 1986. The Marine diatom genus *Rhizosolenia*. A new approach to the taxonomy. Lund, Sweden: 196 pp.
- Thröndsen J. 1978. Preservation and storage. En: A. Sournia (Ed.) *Phytoplankton manual*. UNESCO, París: 69-74.
- Thröndsen J. 1993. The Planktonic Marine Flagellates. In Tomas C. (ed.). *Marine Phytoplankton a guide to naked flagellates and coccolithophorids*, Cap. 2. Academic Press, Inc. San Diego. 7-145 pp.
- UNESCO. 1978. *Manual de Fitoplancton*.
- UNESCO. 1981. Programa de plancton para el Pacífico Oriental. *Informes de la UNESCO sobre Ciencias del Mar*. Inst. Mar Perú, Callao 11:25-26.

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

UNESCO 1996. Design and Implementation Some Harmful Algal Monitoring Systems, Intergovernmental Oceanographic Commission
 UNESCO. 2004. Manual on Harmful Marine Microalgae.
 Utermöhl, H. (1958). Zur Vervollkomnung der Quantitativen Phytoplankton Methodik Mitt. Inter. Ver. Limnol. 9: 1-38.

11. ANEXOS

F1A: FICHA DEL ENSAYO SEMICUANTITATIVO DE FITOPLANCTON MARINO

LABORATORIO QUE REALIZA EL ENSAYO

Monitoreo: _____	Fecha muestreo: _____
Estación: _____	Hora de Inicio: _____
Código de muestra: _____	Hora de término: _____
Latitud: _____	Profundidad: _____
Longitud: _____	TSM (°C) _____
Abertura de malla: _____	Fecha de análisis _____
Método de análisis: _____	Observaciones: _____

RESULTADOS

Fitoplancton %

Taxa/Grupo/ Especie	Abundancia relativa
Diatomeas	
<i>Pseudo-nitzschia cf. delicatissima</i>	
<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	
Dinoflagelados	
<i>Alexandrium minutum</i>	
<i>Dinophysis acuminata</i>	
<i>Dinophysis caudata</i>	
<i>Dinophysis tripos</i>	
<i>Dinophysis rotundata</i>	

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

<i>Lyngulodinium polyedra</i>	
<i>Prorocentrum cf. balticum</i>	
<i>Prorocentrum minimum</i>	
<i>Prorocentrum lima</i>	
<i>Protoperidinium crassipes</i>	
<i>Protoperidinium depressum</i>	

Firma del Analista y/o Supervisor

F2A: FICHA DE ENSAYO CUANTITATIVO DE FITOPLANCTON

LABORATORIO QUE REALIZA EL ENSAYO

Monitoreo:		Fecha muestreo:	
Estación:		Hora de Inicio:	
Código de muestra:		Profundidad:	
Latitud:		TSM o TFM (°C)	
Longitud:		Fecha de análisis	
Método de análisis:			
Observaciones:			

RESULTADOS

Taxa/Grupo/ Especie	Densidades (Cel.L-1)	Porcentaje
Diatomeas		
<i>Pseudo-nitzschia cf. delicatissima</i>		
<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>		
TOTAL DIATOMEAS		
Dinoflagelados		
<i>Alexandrium minutum</i>		
<i>Dinophysis acuminata</i>		
<i>Dinophysis caudata</i>		
<i>Dinophysis tripos</i>		

Reemplaza a: Manual de DIGESA Revisión: 00 Fecha: Octubre del 2001	MANUAL DE MÉTODOS DE ENSAYO PARA MARISCOS Y AGUAS SANIPES	Código: Revisión: 01 Elaborado por: MAP Revisado por: ASM Aprobado por: MAG Fecha: Agosto, 2009
--	--	--

<i>Dinophysis rotundata</i>		
<i>Lyngulodinium polyedra</i>		
<i>Prorocentrum cf. balticum</i>		
<i>Prorocentrum minimum</i>		
<i>Prorocentrum lima</i>		
<i>Protoberidinium crassipes</i>		
<i>Protoberidinium depressum</i>		
TOTAL DINOFLAGELADOS		
TOTAL DE FITOPLANCTON (Cel.L-1)		

Firma del Analista y/o Supervisor