 GOBIERNO DE CHILE INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA	PROCEDIMIENTO RECuento DE COLIFORMES EN MEDIO SÓLIDO	Fecha emisión: 1992
		Revisión: 5
		Fecha revisión: 16-04-2009
Sección Microbiología de Alimentos	PRT-712.03-008	Página 1 de 6

1. OBJETIVO

Este método es utilizado para realizar recuento de bacterias del grupo coliformes, como indicador sanitario.

2. CAMPO DE APLICACIÓN Y ALCANCE

Aplicar este procedimiento a muestras de alimentos en los cuales se sospecha una carga bacteriana alta y que soliciten este análisis.

3. FUNDAMENTO


Violet Red Bilis Agar (VRBA) también conocido como Agar Rojo Neutro Cristal Violeta (RNCV), se utiliza en la enumeración de coliformes. Contiene peptona como fuente de carbono y nitrógeno. Extracto de levadura como fuente de complejo vitamínico B, el cual estimula el crecimiento bacteriano. Las sales biliares y el cristal violeta inhiben el desarrollo de Gram positivos. Lactosa como fuente de carbohidrato y rojo neutro como indicador de pH.

Los organismos fermentadores de lactosa, como los coliformes crecen formando colonias rojas con sin zona de precipitación, en cambio los no fermentadores de lactosa se desarrollan formando colonias incoloras a transparentes con sin zona de precipitación.

Para la confirmación de coliformes se debe traspasar colonias aisladas a Caldo Bilis Verde Brillante.

4. REFERENCIAS

4.1 Bacteriological Analytical Manual Online. September 2002. Capítulo 4 punto G.

 <p>GOBIERNO DE CHILE INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA</p>	PROCEDIMIENTO RECuento DE COLIFORMES EN MEDIO SÓLIDO	Fecha emisión: 1992
		Revisión: 5
		Fecha revisión: 16-04-2009
Sección Microbiología de Alimentos	PRT-712.03-008	Página 2 de 6

5. TERMINOLOGÍA

5.1 Grupo coliformes

El grupo coliformes incluye bacilos Gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa formando ácido y gas dentro de 48 horas a 35°C. Este grupo incluye a los géneros: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*

6. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

6.1 EQUIPOS


- 6.1.1 Incubadora a 35° ± 1°C
- 6.1.2 Propipeta
- 6.1.3 Asa calibrada

6.2 MATERIALES

- 6.2.1 Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 mL.
- 6.2.2 Placas Petri de 100 mm de diámetro
- 6.2.3 Tubos de fermentación de 18 x 180 mm y 16 x 160 mm
- 6.2.4 Asa de 3 mm de diámetro
- 6.2.5 Propipeta

6.3 MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

- 6.3.1 Agar Rojo Neutro Cristal Violeta (RNCV)
- 6.3.2 Caldo Bilis Verde Brillante 2% (BVB)
- 6.3.3 Agua de dilución **Butterfiel**.
- 6.3.4 Agua peptonada 0,1%
- 6.3.5 Reactivos Tinción de Gram

 <p>GOBIERNO DE CHILE INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA</p>	PROCEDIMIENTO RECuento DE COLIFORMES EN MEDIO SÓLIDO	Fecha emisión: 1992
		Revisión: 5
		Fecha revisión: 16-04-2009
Sección Microbiología de Alimentos	PRT-712.03-008	Página 3 de 6

7. DESARROLLO

7.1 TEST PRESUNTIVO

- 7.1.1 Preparar la muestra y diluciones, según PRT-712.00-002, utilizando agua de dilución **Butterfiel**.
- 7.1.2 Sembrar 2 diluciones en duplicado de la muestra, en profundidad con agar Rojo Neutro Cristal Violeta (RNCV). Inocular 4 placas Petri, dos con 1 ml. de la dilución 10^{-1} y dos con 1 ml. de la dilución 10^{-2} .
- 7.1.3 Verter en cada placa 10 ml. de agar RNCV temperado a 48° C.
- 7.1.4 Mover las placas con movimientos rotatorios, para mezclar la muestra y el medio de cultivo.
- 7.1.5 Cuando el agar este solidificado agregar aproximadamente 5 ml. de agar RNCV temperado, sobre la superficie del agar, formando una capa superficial para prevenir el crecimiento invasivo.
- 7.1.6 Dejar solidificar el agar, e incubar las placas invertidas a $35^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 hrs. En alimentos lácteos incubar a 32 ° C.
- 7.1.7 Se deben incluir cultivos control en la incubadora, se usa *Escherichia coli* como control positivo y *Staphylococcus aureus* como control negativo. Se debe inocular siempre el control negativo antes del positivo. Incluir tubos de medios de cultivo sin inocular para controlar la esterilidad de los medios de cultivo y placas Petri abiertas y cerradas para control de ambiente.
- 7.1.8 Al término del período de incubación, seleccionar la dilución cuyas placas contengan entre 25 y 250 colonias, contar las colonias sospechosas tanto típicas como atípicas y registrar el resultado multiplicando el número de colonias por la dilución correspondiente en el registro código **RG-712.00-072**.
- Colonias típicas: lactosa positivo, de color rojo intenso, con zona de precipitado de ácidos biliares, **diámetro de 0,5 mm o mayor**.
- Colonias atípicas: pueden ser de color rosado, amarillento o café claro, con o sin precipitado.
- 7.1.9 Anotar los resultados de los cultivos control en el registro **RG-712.00-004**, de la esterilidad de los medios en el registro **RG-712.00-006** y los controles ambiente en el registro **RG-712.00-050**.

 GOBIERNO DE CHILE INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA	PROCEDIMIENTO RECuento DE COLIFORMES EN MEDIO SÓLIDO	Fecha emisión: 1992
		Revisión: 5
		Fecha revisión: 16-04-2009
Sección Microbiología de Alimentos	PRT-712.03-008	Página 4 de 6

7.2 TEST CONFIRMATIVO PARA GRUPO COLIFORMES

- 7.2.1 Seleccionar por lo menos 10 colonias sospechosas e inocular **en caldo BVB conteniendo tubo de fermentación**.
- 7.2.2 Incubar los tubos de caldo BVB a $35^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. **Examinar los tubos por producción de gas a las 24 y 48 horas**. Incluir como control positivo una cepa de *E coli* y como control negativo una cepa de *Staphylococcus aureus*. **Incluir tubos de medios de cultivo sin inocular para controlar la esterilidad de los medios de cultivo**.
- 7.2.3 Al término del período de incubación observar la formación de gas en los tubos de fermentación. Registrar como positivo aquellos tubos que presenten gas, la ausencia de gas es considerado un test negativo en el registro código **RG-712.00-072** y los resultados de las cepas control en el registro código **RG-712.00-004** y de la esterilidad de los medios en el registro **RG-712.00-006**.
- Se considera positivo cuando al menos un tubo presenta gas, y como negativo cuando en ningún tubo se observa gas.
- Nota:** Si los tubos de caldo BVB muestran una película realizar tinción Gram para asegurar que la producción de gas no fue debido al desarrollo de bacilos fermentadores de lactosa Gram positivos.
- 7.2.4 Para detectar la presencia de *E coli*, procesar la muestra de acuerdo al **PRT- 712.03-037**.

7.3 CALCULO

Cuando todas las colonias sometidas a confirmación dan un resultado positivo, significa que el recuento presuntivo fue confirmado totalmente, si solo algunas colonias resultan positivas, es necesario calcular el recuento de coliformes totales, de la siguiente forma:

$$\text{Rcto de coliformes} = \frac{\text{Rcto. Estimado} \times \text{N}^{\circ} \text{ de colonias confirmadas}}{\text{N}^{\circ} \text{ de colonias inoculadas}}$$

Ejemplo cálculo de recuento.

$$\text{Rcto. de coliformes} = \frac{150000 \times 3}{5} = 90000.$$


 GOBIERNO DE CHILE INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA	PROCEDIMIENTO RECuento DE COLIFORMES EN MEDIO SÓLIDO	Fecha emisión: 1992
		Revisión: 5
		Fecha revisión: 16-04-2009
Sección Microbiología de Alimentos	PRT-712.03-008	Página 5 de 6

7.4 EXPRESION DE RESULTADOS

Los resultados del Recuento de coliformes se expresan cuantitativamente en N° ufc./g.o mL de muestra.

8. REGISTROS

Identificación del registro	Almacenamiento	Protección	Recuperación	Tiempo retención y disposición
RG-712.00-072. Registro de resultados análisis de coliformes, <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> en muestras de alimentos	Archivador rotulado: Registro de Lectura e Informe de Resultados Lab 348	Bajo custodia Lab. 348	Papel	Almacenar por 5 años y luego disponer en la basura cortado en trozos.
RG-712.00-004 Registro cepas control de incubadoras.	Archivador rotulado: Registro Cepas Control Incubadoras Lab 348	Bajo custodia Lab. 348	Papel	Almacenar por 5 años y luego disponer en la basura cortado en trozos.
RG-712.00-006 Registro control de esterilidad de medios de cultivo utilizados en el análisis de coliformes, coliformes fecales y <i>Escherichia coli</i>	Archivador rotulado: Registro Cepas Control Incubadoras Lab 348.	Bajo custodia Lab. 348	Papel	Almacenar por 5 años y luego disponer en la basura cortado en trozos.
RG-712.00-050. Registro control de ambiente laboratorio Enterobacterias	Archivador rotulado: Registro Cepas Control Incubadoras Lab 348.	Bajo custodia Lab. 348	Papel	Almacenar por 5 años y luego disponer en la basura cortado en trozos.

 GOBIERNO DE CHILE INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA	PROCEDIMIENTO RECuento DE COLIFORMES EN MEDIO SÓLIDO	Fecha emisión: 1992
		Revisión: 5
		Fecha revisión: 16-04-2009
Sección Microbiología de Alimentos	PRT-712.03-008	Página 6 de 6

9. TABLA DE MODIFICACIONES

Revisión N°	Pág. Modificada	Motivo del cambio	Fecha Aprobación
5	1	Agrega fundamento	16-04-2009
5	2	Se acota: Agua de dilución Butterfiel. Se actualiza PRT y agrega rango de temperatura	16-04-2009
5	3	Se actualizan Registros. En 7.2, se corrige numeración y se cambia redacción.	16-04-2009
5	4	Se cambia la presentación del ejemplo	16-04-2009

10. ANEXOS

No Aplica