



MicroSnap® Coliform y *E. coli*

Dispositivos por usar:

Opciones de enriquecimiento

- N° de producto MS1-CEC (MicroSnap® Coliform & *E. coli* Enrichment Device)
- N° de producto MS1-N-BROTH-9ML (MicroSnap® Enhanced Nutrient Broth en viales de 9 ml)
- N° de producto MS1-EB-BROTH-9ML (MicroSnap® Enhanced EB Broth en viales de 9 ml)

Opciones de detección

- N° de producto MS2-COLIFORM (Dispositivo de detección de coliformes MicroSnap®)
- N° de producto MS2-ECOLI (Dispositivo MicroSnap® para la detección de *E. coli*)



Introducción

Descripción y uso previsto

MicroSnap® Coliform y *E. coli* son pruebas rápidas basadas en bioluminiscencia usadas para la detección y recuento de organismos coliformes y *Escherichia coli* en productos y muestras ambientales realizadas entre 6 u 8 horas. Las pruebas para MicroSnap Coliform y *E. coli* constan de un dispositivo de enriquecimiento que contiene un medio de crecimiento específico y un dispositivo de detección que contiene un sustrato bioluminogénico en el que se mide la reacción de detección de esta bioluminiscencia utilizando un luminómetro portátil de Hygiena®.

El procedimiento de prueba se realiza en dos pasos; requiere un breve período de incubación que facilita la recuperación de las bacterias, seguido de un paso de detección. El tiempo de incubación de una muestra está determinado de acuerdo con el nivel de sensibilidad requerido. Durante la incubación, las bacterias utilizan los recursos alimenticios disponibles en el medio y producen más beta-galactosidasa y beta-glucuronidasa, que son las enzimas de diagnóstico necesarias para la reacción bioluminogénica.

Después de la incubación, una pequeña cantidad de la solución enriquecida del Dispositivo de Enriquecimiento se transfiere al Dispositivo de Detección, se activa, se incuba durante 10 minutos más y a continuación, se mide en un luminómetro EnSURE® Touch. Los sustratos específicos reaccionan con las enzimas de diagnóstico para producir luz. Cuanto mayor sea el número de bacterias en la muestra, mayor será la concentración del biomarcador y mayor la producción de luz. La luz se mide en pocos segundos. La unidad de medida son las unidades formadoras de colonias (UFC). La emisión de luz es directamente proporcional a la concentración inicial de contaminación bacteriana en muestras previamente enriquecidas.

Algunos tipos de muestras, como las suspensiones líquidas opacas o las muestras con valores de pH extremos, pueden requerir dilución. En estos casos, ofrecemos viales de 9 ml que contienen caldos de enriquecimiento patentados para su uso en lugar del dispositivo de enriquecimiento Step-1. El uso de caldos enriquecidos en viales de 9 ml no está incluido en la certificación *Performance Tested MethodsSM* (PTM) del AOAC Research Institute (RI) (n° 071302).

El caldo de enriquecimiento EB mejorado (vial de 9 ml) es más selectivo para organismos coliformes y *E. coli* en presencia de bacterias lácticas que producen ácido láctico (BAL) o *Enterobacteriaceae*, mientras que el caldo de nutrientes mejorado (vial de 9 ml) proporciona una mejor recuperación de bacterias aeróbicas, organismos coliformes y *E. coli*. En la Tabla 1 se resume la información útil para seleccionar un caldo de enriquecimiento MicroSnap.



Tabla 1. Guía de selección del caldo MicroSnap mejorado.

Tipo de prueba a realizar	Tipo de vial
Cuenta total y coliformes/ <i>E. coli</i>	Caldo nutritivo mejorado
<i>Enterobacterias</i> y coliformes/ <i>E. coli</i>	Caldo EB mejorado
Coliformes/ <i>E. coli</i> – Muestras con flora poco saturada	Caldo nutritivo mejorado
Coliformes/ <i>E. coli</i> – Muestras con flora altamente saturada.	Caldo EB mejorado

Usuario previsto quien se prevé que realice la prueba

El personal de laboratorio con formación en prácticas microbiológicas estándares está calificado para utilizar los dispositivos MicroSnap Coliform y *E. coli*.

Aplicabilidad

MicroSnap Coliform and *E. coli* es aplicable para el recuento de organismos coliformes y *E. coli* en superficies para control ambiental, muestras de productos, agua y otros líquidos filtrables. El método se validó mediante la certificación AOAC RI PTM para una variedad de alimentos, incluidos los grupos de alimentos cárnicos, lácteos, mariscos, verduras y bebidas. Para más detalles, consulte el certificado AOAC RI PTM nº 071302 en www.hygiena.com/documents.

Material necesario (no suministrado)

- Luminómetro EnSURE Touch (Nº de producto ETOUCH)
- Incubador de gradilla en seco (a $37 \pm 0,5$ °C) (Nº de producto INCUBATOR o INCUBATOR2)
- Opciones y capacidades al seleccionar la gradilla del incubador.
 - 35 pocillos para hisopos usados en INCUBATOR2 (Nº de producto IB001)
 - 15 pocillos para viales de 9 ml usados en INCUBATOR2 (Nº de producto IB002)
 - 12 pocillos para hisopos usados en INCUBATOR (Nº de producto IB003)
 - 6 pocillos para viales de 9 ml usados en INCUBATOR (Nº de producto IB004)

Materiales necesarios en los ensayos de muestras de productos (no suministrados)

- Bolsas para las muestras
- Equipos de homogeneización
- Pipetas y puntas capacidad 1 ml
- Opciones de diluyente de muestras para los productos:
 - Agua de peptona a temperatura ambiente.
 - Diluyente de máxima recuperación
Nota: El diluyente de máxima recuperación se utilizó para el estudio de validación PTM de AOAC RI.
 - Diluyente de Butterfield
 - Agua estéril

Consideraciones importantes antes de empezar la prueba

- Para las muestras que puedan requerir dilución (por ejemplo, soluciones opacas; muestras que puedan contener desinfectantes, tensioactivos u otros compuestos inhibidores), utilice el caldo MicroSnap Enhanced EB Broth o Nutrient Broth para el enriquecimiento (para más detalles, véanse [el apéndice](#) y los [diagramas](#)).



- Las muestras de producto pueden almacenarse antes de su uso entre 2 y 8 °C durante un máximo de 2 días, pero deben equilibrarse a temperatura ambiente (entre 20 y 25 °C) antes de ser analizadas con el dispositivo MicroSnap Coliform y *E. coli*.
- Los dispositivos o viales de enriquecimiento (es decir, MicroSnap Coliform and *E. coli* Enrichment Devices, MicroSnap Enhanced EB Broth y MicroSnap Enhanced Nutrient Broth) y los dispositivos de detección (es decir, MicroSnap Coliform Detection Devices y MicroSnap *E. coli* Detection Devices) deben equilibrarse a 20 a 25 °C antes de su uso.
- Utilice técnicas asépticas: cuando recoja muestras o transfiera muestras enriquecidas, no toque con los dedos el hisopo ni el interior del dispositivo o el vial de enriquecimiento.

Procedimiento de ensayo

Paso 1: Enriquecimiento

El procedimiento de enriquecimiento se describe a continuación y también se muestra en [los diagramas del Paso 1](#).

1. Recoja y prepare la muestra, según el tipo de muestra indicado:
 - a. Para muestras de superficies: utilice el dispositivo de enriquecimiento previamente humedecido para tomar muestras de un área cuadrada de 10 x 10 cm (4 x 4 pulgadas).

Consejos importantes sobre la técnica de hisopado:

 - i. Aplique suficiente presión para crear flexión en el vástago del hisopo.
 - ii. Pase el bastoncillo de forma entrecruzada en sentido vertical, horizontal y diagonal en ambas direcciones.
 - iii. Gire el hisopo mientras recoge la muestra para maximizar la recogida de muestra en la punta del hisopo.
 - iv. En el caso de superficies irregulares, asegúrese de que la técnica de frotado es la misma en cada prueba y frote una zona lo suficientemente amplia como para recoger una muestra representativa.
 - b. Muestras líquidas: transfiera 1 ml de una muestra líquida o de agua directamente al dispositivo de enriquecimiento.
 - c. Muestras de productos sólidos - Transfiera 1 ml de una suspensión apropiada, por ejemplo, homogenizado de alimentos al 10% p/v, directamente al dispositivo de enriquecimiento.
 - i. El homogenizado de alimentos debe prepararse pesando 10 o 50 g de muestra alimentaria y añadiéndola a una bolsa que contenga 90 ml o 450 ml de diluyente, respectivamente.
 - ii. En caso de contaminación desconocida de la muestra, prepare y pruebe diluciones seriadas 1:10 (es decir, 10%, 1% y 0,1%).
 - iii. Si se necesitan muestras repetidas, deben extraerse otros 10 g o 50 g de la muestra a granel y repetirse la serie de diluciones. La repetición puede lograrse extrayendo varias alícuotas de 1 ml de las diluciones al 10%, 1% o 0,1%, en función de las UFC obtenidas.

Nota: Al realizar pruebas comparativas, los ensayos de muestras deben iniciarse con un intervalo de 10 minutos para obtener resultados comparables entre métodos.
 - d. Vuelva a colocar el hisopo en el tubo. El dispositivo debe tener el mismo aspecto que cuando se sacó de la bolsa.
2. Active el dispositivo de enriquecimiento sujetando firmemente el tubo que contiene el hisopo y utilice el pulgar y el índice para romper la válvula de retención doblando el bulbo hacia adelante y hacia atrás.



3. Separe la parte superior del dispositivo, tomándolo de la parte que tiene el bulbo y levántelo, de tal forma que la punta del hisopo quede por encima del fluido y apriete el bulbo para verter todo el medio de cultivo dentro del tubo que contiene el hisopo. Asegúrese de que la mayor parte del medio de cultivo se encuentra en el fondo del tubo.
4. Vuelva a cerrar el dispositivo nuevamente usando la parte que tiene el hipopo y ajústelo firmemente para sellar el dispositivo a continuación agite suavemente el tubo para mezclar la muestra y el caldo de cultivo.
5. Incubar a $37 \pm 0,5$ °C durante 6 horas $\pm$ 10 minutos para obtener resultados de tipo cuantitativos (enumeración) u 8 - 24 horas para obtener resultados de tipo cualitativos (ausencia/presencia).

Nota: En los estudios cualitativos de validación PTM de AOAC RI, las muestras se incubaron durante 8 horas $\pm$ 10 minutos.

Paso 2: Detección

El procedimiento de detección se describe a continuación y además en instrucciones correspondientes a [MicroSnap Enrichment Devices](#) o [MicroSnap Enhanced Broth Vials](#).

Antes de comenzar el Paso 2, encienda el luminómetro. Si ha programado su muestra para el dispositivo MicroSnap en el luminómetro, abra la pantalla de prueba de la muestra que desea probar.

Recuerde equilibrar el dispositivo de detección de coliforme y *E. coli* MicroSnap (MS2-COLIFORM o MS2-ECOLI) a temperatura ambiente (10 minutos en 20 a 25 °C) antes de utilizarlos.

1. Agite el dispositivo de prueba dando 5 golpecitos con la palma de la mano o agitándolo una vez con fuerza hacia abajo.
Nota: Esto es necesario para llevar el líquido al fondo del tubo, lo que facilitará la mezcla de la muestra enriquecida con el agente extractor en el tubo.
2. Transfiera asépticamente 0,1 ml (2 gotas) de muestra enriquecida al Dispositivo de Detección.
 - a. Para los dispositivos de enriquecimiento MicroSnap, utilice la punta cuentagotas incorporada como pipeta:
 - i. Apriete y suelte el bulbo del Dispositivo de Enriquecimiento para mezclar y aspirar la muestra hacia el bulbo.
 - ii. Abra asépticamente el Dispositivo de Enriquecimiento y el Dispositivo de Detección girando y tirando para separar la parte que tiene el bulbo y el hisopo.
 - iii. Inserte la punta del hisopo del dispositivo de enriquecimiento 3 cm (1 pulgada) en la parte superior del tubo del dispositivo de detección y apriete suavemente el bulbo del dispositivo de enriquecimiento para transferir 2 gotas de la muestra enriquecida al tubo de detección
Nota: Se añade una línea de llenado al tubo como referencia. Los volúmenes de transferencia inconsistentes aumentan la variación de los resultados de la prueba.
 - b. Para viales de caldo MicroSnap:
 - i. Retire el vial de caldo mejorado de la incubadora y agítelo manualmente o en vórtex durante 10 segundos para homogenizar la muestra.
 - ii. Destape asépticamente el vial y a la vez abra el Dispositivo de Detección girando y tirando para separar la parte que tiene el bulbo.
 - iii. Pipetear asépticamente 0,1 ml de la muestra enriquecida directamente dentro del tubo del Dispositivo de Detección.



- c. Vuelva a montar el dispositivo de enriquecimiento a su estado original y vuelva a tapar el vial y devuelva la muestra a la incubadora para posiblemente repetir el análisis si se requiere.

Nota: Cuando se analizan réplicas de la misma muestra enriquecida, todas las réplicas deben realizarse con un intervalo de 10 minutos para obtener resultados comparables.

3. Active el Dispositivo de Detección sujetándolo firmemente del tubo y utilice el pulgar y el índice para romper la Válvula de Retención doblando el bulbo hacia adelante y hacia atrás. Apriete el bulbo 3 veces para liberar todo el líquido hacia el fondo del tubo.
4. Agitar suavemente durante 2 segundos para mezclar.
5. Incubar el dispositivo de detección durante $10 \pm 0,5$ minutos a $37 \pm 0,5$ °C.
6. Introduzca inmediatamente todo el dispositivo en el luminómetro, cierre la tapa y, mientras mantiene la unidad en posición vertical, pulse el botón para iniciar la medición.
7. Los luminómetros EnSURE Touch muestran los resultados en UFC en 10 segundos.

Nota: Las muestras MicroSnap pueden programarse directamente en el luminómetro o utilizando el software SureTrend®.

Información adicional

Otras pruebas

Si se obtiene un resultado positivo utilizando el dispositivo MicroSnap de detección de coliformes (MS2-COLIFORM), confirme la presencia o ausencia de *E. coli* en la muestra repitiendo [el paso 2](#): Instrucciones de detección anteriores utilizando otra alícuota de la misma muestra enriquecida y el dispositivo MicroSnap de detección de *E. coli* (MS2-ECOLI). Si sólo se realizan pruebas de *E. coli*, debe considerarse una prueba confirmatoria adicional, como la PCR en el sistema BAX® de Hygiena.

Límite potencial de detección

El límite de detección es el nivel más bajo de bacterias aerobias viables que puede detectarse en muestras perteneciendo a la industria de tipo alimentaria cuando el ensayo se realiza correcta y eficazmente.

Tabla 2. Rango dinámico potencial (límite de detección) para el luminómetro EnSURE Touch.

Tipo de muestra	Rango de UFC* (Periodo de enriquecimiento: 6 h $\pm$ 10 min)	Presencia o ausencia de UFC (Periodo de enriquecimiento: 8 h $\pm$ 10 min) [†]
Superficie	10 - 10.000 UFC/hisopado	0 (ausencia) 1 UFC (precaución) ≥ 2 UFC (presencia)
Producto		
Líquido (1 ml)	10 - 10.000 UFC/ml	
Suspensión de sólido (10% p/v)	100 - 10.000 UFC/g	

* Factores adicionales, como diluciones, tiempos de incubación y tipos de muestra, pueden alterar los rangos indicados en esta tabla. Si la contaminación de la muestra está por encima de los rangos detallados en esta tabla, deben hacerse diluciones para que la contaminación esté dentro del rango detectable del luminómetro. Por ejemplo:

-1% de suspensión será de 1.000 - 100.000 UFC para una incubación de 6 horas.

-Una suspensión al -0,1% será de 10.000 - 1.000.000 UFC para una incubación de 6 horas.

[†] La incubación para los resultados de presencia/ausencia puede prolongarse hasta 24 horas. **Nota:** El tiempo de enriquecimiento fue de 8 horas $\pm$ 10 minutos para los estudios cualitativos de validación PTM de AOAC RI.



Interpretación de los resultados

Los resultados de los luminómetros EnSURE Touch se muestran en UFC, proporcionando resultados cualitativos (presencia/ausencia) y cuantitativos (UFC/g o UFC/ml).

Cuando se preparan y analizan varias diluciones para muestras con contaminación desconocida, las UFC/g o UFC/mL se calculan multiplicando el resultado de UFC por el factor de dilución correspondiente. El software EnSURE Touch realiza esta conversión, utilizando los datos generados a partir de los estudios de validación PTM de AOAC RI, así como pruebas internas adicionales.

Certificación AOAC RI del desempeño de los métodos probados.

La detección de organismos coliformes y *E. coli* mediante el sistema MicroSnap Coliform and *E. coli* (es decir, el dispositivo de enriquecimiento MicroSnap Coliform and *E. coli* Enrichment Device con el dispositivo de detección de coliformes MicroSnap Coliform Detection Device o el dispositivo de detección de *E. coli* MicroSnap *E. coli* Detection Device) y los luminómetros Hygiena ha obtenido la certificación AOAC RI PTM (licencia nº 071302) del Instituto de Investigación de la AOAC.



Los alimentos analizados en el marco de la validación AOAC RI PTM se enumeran en la Tabla 3.

En EnSURE Touch, seleccione «Productos» como **tipo de muestra** para utilizar los algoritmos de conversión de RLU a UFC incluidos en la certificación AOAC RI PTM (tabla 3).

Tabla 3. Tipos de muestras validadas con MicroSnap Coliform y *E. coli* en luminómetros Hygiena.

Cuantitativo (Enriquecimiento: 6 horas ± 10 minutos)		Cualitativo (Enriquecimiento: 8 horas ± 10 minutos)	
Coliformes	<i>E. coli</i>	Coliformes	<i>E. coli</i>
Carne molida cruda	Carne molida cruda	Carne molida cruda	Carne molida cruda
Sándwich BLT	Sándwich BLT	--	Sándwich BLT
Bacalao crudo	Bacalao crudo	Bacalao crudo	Bacalao crudo
Pollo cocido	Pollo cocido	Pollo cocido	Pollo cocido
Lechuga	Lechuga	Lechuga	--
Leche	Leche	Leche	Leche
Pollo crudo	Pollo crudo	Pollo crudo	Pollo crudo
Jamón RTE	Jamón RTE	--	--
Camarones crudos	Camarones crudos	Camarones crudos	Camarones crudos
Agua embotellada	Agua embotellada	Agua embotellada	Agua embotellada

Validaciones adicionales de Hygiena

Matrices

Además de los grupos de muestras incluidas en los estudios de certificación AOAC RI PTM (Tabla 3), los laboratorios Hygiena siguen analizando otro tipo de muestras, como la leche con chocolate y la leche pasteurizada. Las pruebas óptimas para algunos tipos de muestras implican el uso de los viales de caldo EB mejorado o caldo de nutrientes mejorado (9 ml), que no se incluyeron en la certificación AOAC RI PTM. Para las



pruebas cualitativas, algunos usuarios han validado tiempos de incubación prolongados (hasta 24 h), que no están incluidos en la certificación AOAC RI PTM.

Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica en www.hygiena.com/support para obtener información y ayuda con tipos de productos adicionales.

Factores de conversión para tipos de muestras en EnSURE Touch

EnSURE Touch incluye varios algoritmos perfeccionados para convertir RLU a UFC para tipos de muestras específicos, como superficie, listo para el consumo, lácteos, proteínas, productos agrícolas y agua. Estos algoritmos no están incluidos en la certificación AOAC RI PTM.

Limitaciones

Es importante que las muestras se lleven a temperatura ambiente (20 a 25 °C) antes de utilizarlas en los dispositivos MicroSnap. Las muestras que no se lleven a temperatura ambiente antes de la incubación (por ejemplo, tomadas directamente de la refrigeración a 2 a 8 °C) no detectarán lo suficiente debido al tiempo que tardan en alcanzar la temperatura de incubación.

Es importante que todos los medios de cultivo y diluyentes utilizados con MicroSnap Coliform y *E. coli* sean estériles. Los inhibidores en los medios y diluyentes son la razón principal en la mayoría de las detecciones fallidas. Hygiena recomienda los diluyentes listados en la sección de [Materiales Requeridos](#).

Los perfiles enzimáticos de algunos coliformes, como las cepas de *Hafnia alvei*, son diferentes de la mayoría de los demás organismos coliformes, por lo que estas cepas no se detectarán ni enumerarán mediante métodos de detección bioquímica y cromogénica como los utilizados en las pruebas MicroSnap Coliform.

Los organismos con perfiles enzimáticos similares, como *Shigella sonnei*, no pueden ser diferenciados de *E. coli* mediante métodos de detección bioquímicos o cromogénicos como los utilizados en las pruebas MicroSnap *E. coli*.

Además, los perfiles enzimáticos de algunas cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC), como *E. coli* O157:H7, serán detectadas y enumeradas por la prueba MicroSnap Coliform, pero no por la prueba MicroSnap *E. coli*.

Para más detalles, consulte [Precaución y responsabilidad del usuario](#) o póngase en contacto con nosotros.

cSolución a posibles discrepancias

En la Tabla 4 se ofrece orientación sobre cómo resolver algunos efectos de la muestra que se observan con frecuencia. Si desea más información sobre protocolos o ayuda en los tipos de productos, póngase en contacto con nosotros en www.hygiena.com/support.

Tabla 4. Solución de problemas.

Observación	Posible causa	Acción recomendada
UFC inusualmente altas con algunos tipos de productos, como las verduras de hoja verde y los productos lácteos fermentados.	Algunos tipos de muestras contienen naturalmente altos niveles de nucleótidos que pueden aumentar los resultados de UFC.	Póngase en contacto con nosotros para que le ayudemos a personalizar la conversión de RLU a CFU y los niveles de umbral del instrumento para su tipo de muestra.
UFC característicamente bajas con tipos de muestras espesas, opacas u oscuras, como leche o chocolate sin diluir.	Las interferencias en la detección de la luz por el luminómetro pueden deberse a un efecto de blanqueo del tipo de muestra.	Utilice uno de los caldos de cultivo mejorados MicroSnap en viales de 9 ml para el enriquecimiento. Véase el Apéndice para más detalles.



Calibración y controles

Es aconsejable realizar controles positivos y negativos de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio. Hygiena ofrece el siguiente dispositivo de verificación de la calibración: CalCheck LED Dispositivo de Verificación de Calibración (Nº de producto CAL).

Almacenamiento y caducidad

- Conservar entre 2 y 8°C (entre 36 y 46 °F).
- No utilizar después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

Eliminación

Desinfecte antes de desechar. Los dispositivos MicroSnap pueden desinfectarse en autoclave o con Hipoclorito de sodio (sumergir los dispositivos sin sellar en hipoclorito de sodio al 20% durante 1 hora). Después de lo anterior, pueden tirarse a la basura. Alternativamente, los dispositivos MicroSnap pueden desecharse en una instalación de eliminación de residuos de riesgo biológico.

Seguridad y precauciones

- Los componentes del dispositivo MicroSnap no suponen ningún riesgo para la salud si se utilizan correctamente. Los dispositivos usados que confirmen resultados positivos pueden constituir un riesgo biológico y deben desecharse de forma segura de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio y las Normas de Salud y Seguridad (véanse las instrucciones de desecho más arriba).
- Evitar la exposición prolongada a la luz.
- Los dispositivos están diseñados para un solo uso. No reutilizar.
- El personal debe contar con formación en técnicas de análisis y en prácticas microbiológicas reconocidas.

Precauciones y responsabilidad del usuario

- Los dispositivos MicroSnap no han sido probados con todos los posibles productos alimentarios, procesos alimentarios, protocolos de prueba o con todas las posibles cepas de la familia Coliforme.
- Sólo para uso *in vitro*. No para uso en procedimientos de diagnóstico.
- Como ocurre con cualquier prueba basada en un medio de cultivo, los resultados de MicroSnap no constituyen una garantía de calidad del producto.
- Ningún medio de cultivo recuperará la misma cepa o enumerará una cepa determinada de la misma manera que otro medio. Otros factores externos, como el método de muestreo, el protocolo de análisis y la manipulación, pueden influir en la recuperación.
- La toma de muestras debe realizarse de forma aséptica para evitar la contaminación cruzada.
- Al seleccionar un método de ensayo, es responsabilidad del usuario evaluar un número suficiente de muestras.
- Verificar la temperatura y el tiempo de incubación adecuados para la aplicación de la prueba.



- El tiempo de incubación será de 6 horas $\pm$ 10 minutos para resultados cuantitativos (enumeración) o de 8 - 24 horas para resultados cualitativos (presencia/ausencia) como se especifica en las instrucciones anteriores, a menos que el equipo de Investigación y Desarrollo de Hygiena le haya indicado lo contrario para aplicaciones personalizadas que requieran tiempos de incubación (o temperaturas) diferentes.

Nota: En los estudios cualitativos de validación PTM de AOAC RI, las muestras se incubaron durante 8 horas $\pm$ 10 minutos.

- Asegúrese de que la dilución de la muestra es la adecuada para que las muestras puedan leerse dentro del rango dinámico del luminómetro.
- Cuando se analicen diluciones seriadas múltiples, todas las diluciones deben prepararse y analizarse con un intervalo de 10 minutos para obtener resultados lineales.
- Cuando se analizan réplicas de la misma muestra enriquecida, todas las réplicas deben realizarse con un intervalo de 10 minutos para obtener resultados comparables.
- Cuando se realicen pruebas comparativas, los ensayos de las muestras deben iniciarse con un intervalo de 10 minutos para obtener resultados comparables entre métodos.

Responsabilidad higiénica

Como ocurre con cualquier prueba basada en un medio de cultivo, los resultados de MicroSnap Coliform y *E. coli* no constituyen una garantía de calidad de los alimentos, bebidas o procesos que se analizan con estos dispositivos. Hygiena no será responsable ante el usuario u otras personas por ninguna pérdida o daño, ya sea directo o indirecto, incidental o consecuente, derivado del uso de estos dispositivos. Si se demuestra que este producto es defectuoso, la única obligación de Hygiena será sustituir el producto o, a su discreción, reembolsar el precio de compra. Notifique inmediatamente a Hygiena en un plazo de 5 días a partir del descubrimiento de cualquier defecto sospechoso y devuelva el producto a Hygiena; póngase en contacto con el Servicio de Atención al Cliente para obtener un número de autorización de devolución de mercancías.

Información de contacto

Para más información, visite www.hygiena.com/contact. Para obtener asistencia técnica, visite www.hygiena.com/support.

BAX®, EnSURE®, Hygiena®, MicroSnap® y SureTrend® son marcas registradas de Hygiena. Performance Testing MethodsSM es una marca de servicio de AOAC International.



Apéndice: Enriquecimiento de tipos de muestras difíciles con MicroSnap Enhanced EB Broth o Caldo nutritivo MicroSnap mejorado

Los caldos mejorados MicroSnap contienen 9 ml de un medio líquido exclusivo diseñado para cultivar microorganismos aerobios y facultativos al tiempo que mejora la producción de biomarcadores y enzimas específicas de diagnóstico de organismos coliformes y *E. coli* y reduce las interferencias de las muestras. Los caldos están destinados a aplicaciones que requieren la detección de bacterias en muestras de alimentos difíciles, como suspensiones líquidas opacas (véase [la Tabla 1](#)).

MicroSnap Enhanced Nutrient Broth es un medio listo para su uso compatible con los dispositivos de detección MicroSnap Total (MS2-TOTAL), MicroSnap Coliform (MS2-COLIFORM) y MicroSnap *E. coli* (MS2-ECOLI). MicroSnap Enhanced EB Broth es un medio listo para su uso compatible con los dispositivos de detección MicroSnap EB (MS2-EB), MicroSnap Coliform (MS2-COLIFORM) y MicroSnap *E. coli* (MS2-ECOLI). Las instrucciones de este anexo son para enriquecer leche, soluciones opacas y otras muestras de alimentos difíciles para las pruebas de coliformes y *E. coli*. Si necesita ayuda para desarrollar un protocolo para su tipo de producto, incluido el ajuste de las temperaturas de incubación de enriquecimiento, póngase en contacto con Hygiena.

Consejos importantes antes de empezar la prueba

- El uso de los caldos de cultivos mejorados en viales de 9 ml no está incluido en la certificación AOAC RI PTM.
- Inspeccione visualmente el líquido del vial antes de usarlo. El líquido debe ser transparente y de color pajizo claro, no turbio ni opaco.
- Utilice un rotulador permanente para identificar la muestra en la etiqueta del vial.

Paso 1: Enriquecimiento con caldo nutritivo MicroSnap mejorado

El procedimiento de enriquecimiento se describe a continuación y también se muestra en [los diagramas del Paso 1](#).

1. Recoger y preparar la muestra utilizando técnicas asépticas:
 - a. Muestras líquidas: añada 1 ml de muestra directamente al vial de caldo mejorado.
 - b. Muestras sólidas: transfiera 1 ml de una dilución de muestra adecuada en diluyente estéril directamente al vial de caldo mejorado.
2. Vuelva a colocar el tapón y apriételo.
3. Agitar o agitar en vórtex durante 10 segundos para mezclar el contenido.
4. Incube el vial en un incubador Hygiena Digital seco durante 6 u 8 horas, dependiendo del tipo de muestra y de la sensibilidad requerida (Tabla 5).

Tabla 5. Tiempo de incubación, temperatura y rango dinámico potencial.

Tiempo de incubación	Gama de UFC	Caldo nutritivo mejorado		Caldo EB mejorado
		Leche	Alimentos líquidos o sólidos	Leche, alimentos líquidos o sólidos
		32 ± 0.5 °C	30 ± 0.5 °C	37 ± 0.5 °C
6 h ± 10 min	50 - Registro 6	Enumeración	Enumeración	Enumeración
8 h ± 10 min [†]	<5 - 5,000	Presencia/ausencia	Presencia/ausencia	Presencia/ausencia

*No se han validado los períodos de incubación fuera de los plazos definidos.

[†] La incubación para los resultados de presencia/ausencia puede prolongarse hasta 24 horas.

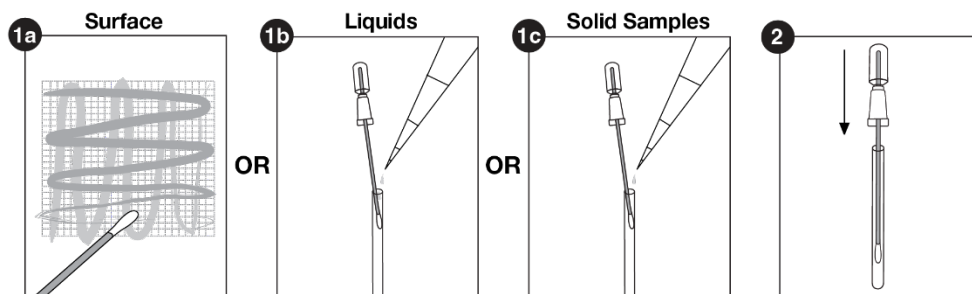
Paso 2: Detección

Siga las [instrucciones de](#) detecciones descritas anteriormente.



Dispositivos MicroSnap® de enriquecimiento y detección de coliformes y *E. coli*

Paso 1: Enriquecimiento de la muestra

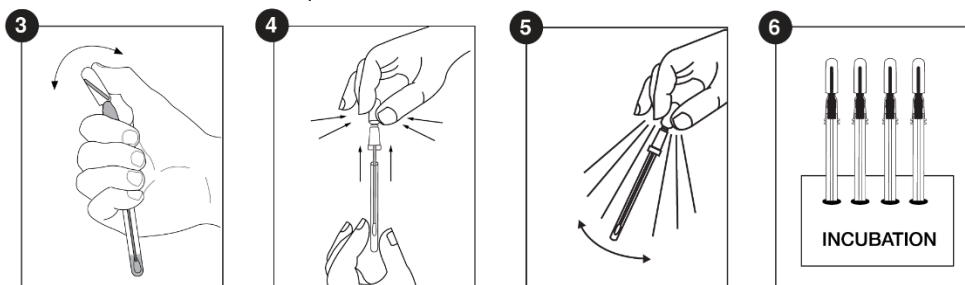


1a. Superficie: Muestrear un área de 10 x 10 cm con el dispositivo de enriquecimiento a temperatura ambiente* (TA). Dispositivo de Enriquecimiento RT.

1b. Líquidos: Añadir 1 ml de alimento líquido, bebida o agua directamente al dispositivo de Enriquecimiento RT.

1c. Muestras sólidas: Añadir 1 ml de suspensión al 10% p/v de muestra sólida directamente al dispositivo de enriquecimiento de RT.

2. Vuelva a insertar el bulbo Snap-Valve en el tubo de la torunda.



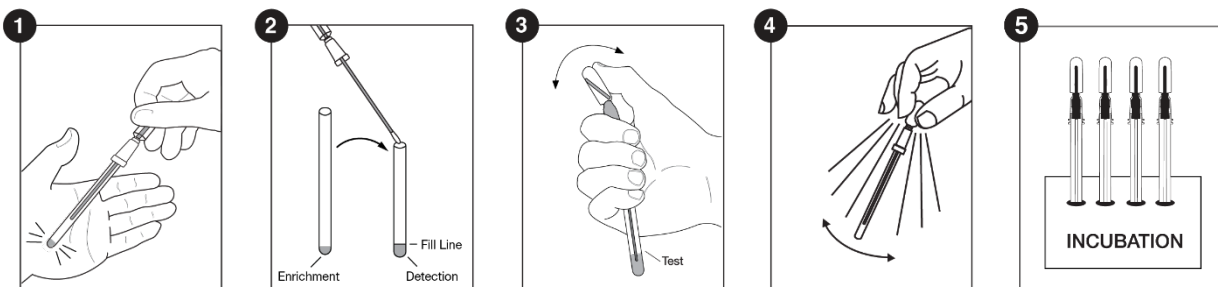
3. Active el dispositivo. Doblando el bulbo, rompiendo la válvula de retención.

4. Levante el bulbo (2,5 cm) y presione para liberar el líquido al fondo del tubo.

5. Vuelva a colocar el bulbo en el tubo y agítelo suavemente para mezclar la muestra en el líquido.

6. Incubar a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante $6\text{ h} \pm 10\text{ min}$ (análisis cuantitativo) u $8\text{ h} \pm 10\text{ min}$ (análisis cualitativo).

Paso 2: Detección o medición



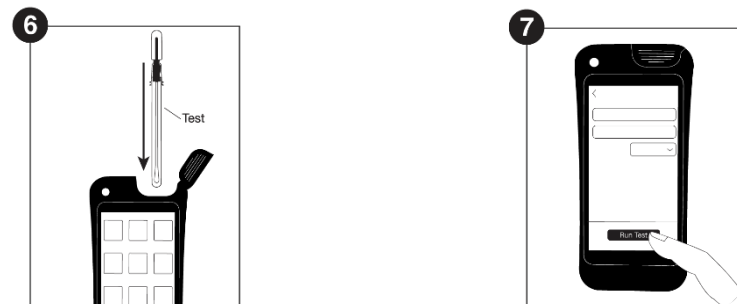
1. Equilibre el dispositivo de detección a temperatura ambiente. Agitar para que el líquido llegue al fondo.

2. Transfiera asépticamente 2 gotas (0,1 ml) de muestra enriquecida del Dispositivo de Enriquecimiento al Dispositivo de Detección.

3. Active el dispositivo de detección (prueba) rompiendo la válvula de retención. Presione el bulbo para liberar el líquido en el tubo.

4. Agitar suavemente el tubo para mezclar la muestra en el líquido.

5. Incubar el dispositivo de detección durante $10 \pm 0,2$ minutos a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$.



6. EnSURE® Touch, aplicación MicroSnap®: Si la muestra está programada, seleccione Muestra; de lo contrario, seleccione **Prueba rápida**. A continuación, pulse **Ejecutar prueba**.

7. EnSURE Touch guarda automáticamente los resultados.* Registra y sincroniza el luminómetro de forma inalámbrica con el software SureTrend® para ver informes y conjuntos de datos.

* Temperatura ambiente = 20 a 25°C .

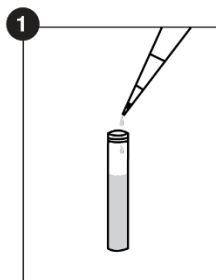
† Si es positivo para Coliformes, la presencia de *E. coli* puede verificarse repitiendo el Paso 2 utilizando otra alícuota de la misma muestra enriquecida y un Dispositivo de Detección de *E. coli*.



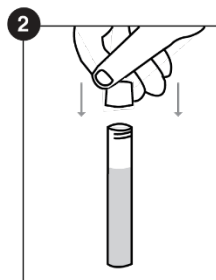
Vial de caldo MicroSnap® mejorada y dispositivo de detección MicroSnap

Nota: El uso del caldo de nutrientes mejorado no está incluido en la certificación AOAC RI PTM.

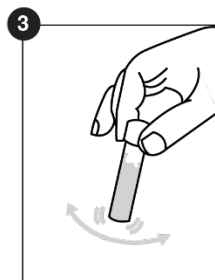
Paso 1: Enriquecimiento de la muestra



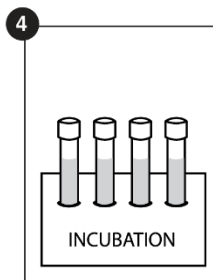
1. Equilibrar la muestra y el caldo a 20 - 25 °C. 2. Añadir 1 ml de la dilución apropiada de las muestras al caldo mejorado.



2. Vuelva a colocar y apriete la tapa.

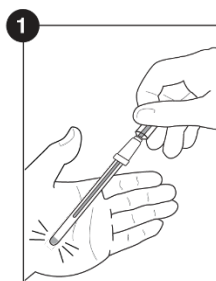


3. Agitar en vórtex durante 10 segundos.

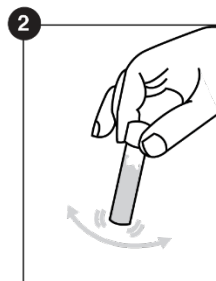


4. Incube durante el tiempo y a la temperatura adecuados para su tipo de muestra. Consulte la Tabla 4 para más detalles.

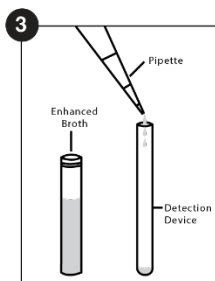
Paso 2: Detección o medición



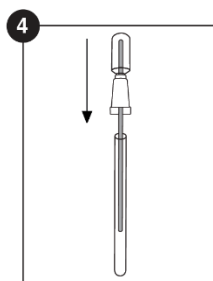
1. Equilibre el dispositivo de detección a temperatura ambiente. Agitar para que el líquido llegue al fondo.



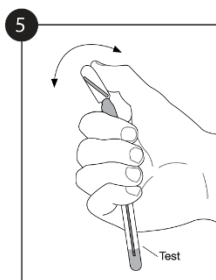
2. Agitar manualmente o en vórtex durante 10 segundos.



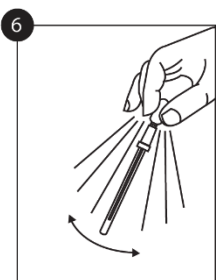
3. Transferir asepticamente 0,1 ml de muestra enriquecida al Dispositivo de Detección.



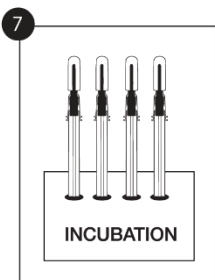
4. Vuelva a montar el dispositivo de detección en su estado original.



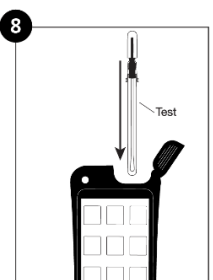
5. Active el dispositivo rompiendo la válvula de retención. Apriete la pera para liberar el líquido en el tubo.



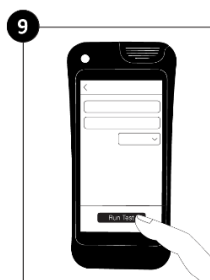
6. Agitar suavemente el tubo para mezclar la muestra en el líquido.



7. Incubar el dispositivo de detección durante $10 \pm 0,2$ minutos a $37 \pm 0,5$ °C.



8. Inserte el dispositivo en EnSURE® Touch. En la aplicación MicroSnap®: Si la muestra está programada, seleccione Muestra; de lo contrario, seleccione **Prueba rápida**. A continuación, pulse **Ejecutar prueba**.



9. EnSURE Touch guarda automáticamente los resultados. Registra y sincroniza el luminómetro de forma inalámbrica con el software SureTrend® para ver informes y conjuntos de datos.