



**FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
BIOLÓGICA
MANUAL DE MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS**

INDICE

	PÁGINA
Practica No. 1 Recomendaciones para el trabajo de Laboratorio.....	2
Practica No. 2 Elaboración de un alimento artesanal.....	4
Practica No. 3 Preparación y dilución de muestras para su análisis microbiológico.....	5
Practica No. 4 Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.....	11
Practica No. 5 Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.....	18
Práctica No. 6 Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable....	24
Práctica No. 7 Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.....	47
Práctica No. 8.- Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> en alimentos.....	54
Práctica No. 9.- Recuento de <i>Salmonella spp</i> en alimentos.....	63
Práctica No. 10.- Determinación de <i>Vibrio cholerae</i> en alimentos.....	91

PRACTICA No. 1 RECOMENDACIONES PARA EL TRABAJO DE LABORATORIO

(Mecanismos de seguridad y salud ocupacional).

Un laboratorio de Microbiología es un lugar convenientemente habilitado donde se pueden manejar y examinar microorganismos. Este tipo de trabajo debe ser llevado a cabo con una buena técnica aséptica, y por tanto se requiere un ambiente **limpio y ordenado**. Cuando manejemos cualquier tipo de muestra debemos evitar que microorganismos ajenos a nuestros cultivos y presentes en el ambiente se introduzcan en ellos contaminándolos, o que los microorganismos de las muestras nos contaminen a nosotros. Por ello trabajaremos **siempre en condiciones de esterilidad**. En el laboratorio de Microbiología encontraremos estas condiciones bien en campanas de seguridad biológica o bien en la proximidad de la llama de un mechero de alcohol o de gas. Aunque los microorganismos que se manipulen no sean considerados patógenos, **todos** los cultivos de **todos** los microorganismos deben ser manejados con precaución por su potencial patogenicidad. En resumen, nunca debe olvidarse la necesidad de cumplir estos dos requisitos básicos:

- 1.- Restringir la presencia de los microorganismos en estudio a sus recipientes y medios de cultivo para evitar el riesgo de contaminarse uno mismo o a un compañero.
- 2.- Evitar que los microorganismos ambientales (presentes en piel, pelo, aire, ropa, etc.) contaminen nuestras muestras.

Además de un ambiente apto para el trabajo microbiológico, el laboratorio de Microbiología requiere una instrumentación básica, para llevar a cabo estudios elementales: Autoclave, Incubadora, Microscopio, Mechero Bunsen, Asa de siembra, colorantes y medios de cultivo, cepas microbianas, etc.

NORMAS DE SEGURIDAD

- 1.- Es imprescindible el uso de bata de laboratorio.
- 2.- Al iniciar y finalizar las prácticas, el estudiante se lavará las manos con agua y jabón.
- 3.- El lugar de trabajo debe estar siempre limpio y ordenado. Antes de comenzar cada práctica es conveniente desinfectar la superficie de trabajo. Los desinfectantes más habituales para este propósito son el cloro y el alcohol (etanol al 96 °C).
- 4.- Los microorganismos deben manejarse siempre alrededor de la llama. Se deben evitar los desplazamientos innecesarios por el laboratorio, ya que pueden crear corrientes que originen contaminaciones o producir accidentes.

- 5.- Durante las prácticas está prohibido comer, beber y fumar. Cuando se manipulan microorganismos hay que evitar llevarse las manos a la boca, nariz, ojos, etc.
- 6.- Libros, carpetas, abrigos y cualquier otro material que no se utilice en la realización de la práctica deben estar apartados del lugar de trabajo.
- 7.- Para deshacernos del material contaminado utilizaremos los recipientes adecuados. Estos recipientes serán esterilizados posteriormente. **Nunca se debe tirar nada por el fregadero o la basura municipal.**
- 8.- Bajo ningún concepto debe sacarse ninguna muestra contaminada del laboratorio.
- 9.- El suministro de gas para los mecheros Bunsen requiere las precauciones propias de estas instalaciones. Las fugas de gas son muy peligrosas, por lo que hay que cerrar todas las llaves de paso de gas al finalizar la práctica, evitar la presencia de sustancias inflamables y revisar periódicamente las conducciones. Asimismo, asegurar que todas las llaves de agua, así como los aparatos eléctricos en la mesa de trabajo estén apagados antes de abandonar el laboratorio.
- 10.- En las prácticas en que se trabaje con luz ultravioleta debe tenerse en cuenta que la exposición a este tipo de radiación es peligrosa, ya que tiene poder mutagénico. Por tanto, nunca se debe mirar directamente el foco emisor. Hay que proteger los ojos y cualquier zona de la piel expuesta a la radiación (gafas, guantes, máscaras, etc.).
- 11.- No se debe pipetear nunca con la boca, utilizar siempre pipeteadores manuales.
- 12.-En caso de accidente (ruptura de material, derramamiento de microorganismos, etc.) se comunicará inmediatamente al docente o técnico académico.

CONTROL DE CALIDAD DEL EQUIPO Y MATERIAL EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

En el Laboratorio de Microbiología el Control de Calidad consiste en una evaluación sistemática del trabajo para garantizar un resultado confiable.

El control de calidad abarca desde la toma de muestra del alimento, transporte, conservación de la muestra, desarrollo de la marcha analítica en base a las Normas Oficiales Mexicanas y emisión de resultados. Todo esto incluye, medios de cultivo, reactivos, métodos, equipo, analista, los cuales se debe llevar un estricto control, de manera que se realicen con precisión y exactitud para llevar a resultados confiables.

El buen funcionamiento del equipo es responsabilidad de todos los que participan en el laboratorio desde el profesor hasta el alumno. Debe de existir un programa de mantenimiento preventivo y correctivo.

Todo laboratorio debe contar con un inventario de reactivos, material, equipo, llevando un control de lo que se utiliza.

DISPOSICION DE RESIDUOS PELIGROSOS BIOLOGICO INFECCIOSOS (RPBI):

La disposición de los Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos, se realizara conforme lo establecido en la NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

PRACTICA No. 2 ELABORACIÓN DE UN ALIMENTO.

El alumno elaborará un alimento de elaboración artesanal, consultando la página, es importante preparar el alimento higiénicamente, revisando los procedimientos y técnicas, así como los procesos de esterilización de tal manera que resulto inocuo. Asimismo, puede elegir un alimento que puede ser: aderezo, cárnicos y embutidos, confitería, conservas de frutas y verduras, instantáneos, lácteos, panificación y pescados y mariscos.

Una vez preparado el alimento se envasará y etiquetará (Revisar las Normas Oficiales Mexicanas de etiquetado y envasado), lo almacenará según las indicaciones y al final del curso le realizará el análisis microbiológico según la Norma Oficial Mexicana que corresponda al alimento.

PRACTICA No. 3 PREPARACIÓN Y DILUCION DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

OBJETIVO:

Establecer el procedimiento para la preparación de diluciones para el análisis microbiológico de productos alimenticios.

Introducción:

Este procedimiento está orientado a proporcionar las guías generales para la preparación de diluciones para el examen microbiológico de alimentos. En vista de la gran cantidad de productos en este campo de aplicación, estas guías pueden ser inapropiadas para todos ellos en forma detallada y para otros requerirse otros métodos diferentes. Sin embargo, en todos los casos donde sea posible se recomienda apegarse a estas guías y modificarse únicamente cuando sea necesario.

La dilución primaria tiene por objeto obtener una distribución lo más uniforme posible de los microorganismos contenidos en la muestra destinada para el análisis.

La preparación de diluciones decimales adicionales, si son necesarias, tiene como objetivo reducir el número de microorganismos por unidad de volumen, para permitir, después de la incubación, la observación de la prueba en el caso de tubos o matraces y la cuenta de colonias en el caso de placas. Se basa en la preparación de diluciones primarias, para obtener una distribución lo más uniforme posible de los microorganismos presentes en la porción de muestra.

Aparatos e instrumentos

- Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170°C.
- Autoclave con termómetro y manómetro, calibrada con termómetro de máximas y mínimas.
- Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de 0,1°C y que mantenga la temperatura a $45 \pm 0,5^\circ\text{C}$.
- Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato o bien un homogeneizador peristáltico (Stomacher).
- Vasos para licuadora con tapa esterilizables o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico.
- Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g.

Materiales

- Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 ml (o si es necesario de 1 ml y 2 ml), con tapón de algodón. Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.
- Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.
- Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca.
- Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.
- Todo el material e instrumentos que tengan contacto con las muestras bajo estudio deberán esterilizarse mediante:
 - Horno, durante 2 h a 170 a 175°C o 1 h a 180°C o
 - Autoclave, durante 15 minutos como mínimo a $121 \pm 1,0^\circ\text{C}$.
- El material de vidrio puede sustituirse por material desechable que cumpla con las especificaciones deseadas. No debe usarse material de vidrio dañado por esterilización repetida y éste debe ser químicamente inerte.

Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico. Cuando se indique agua debe entenderse como agua destilada.

1 Preparación de reactivos

Solución de hidróxido de sodio 1,0 N

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Hidróxido de sodio	4 gr
Agua	100 ml

Preparación:

- Disolver el hidróxido de sodio y llevar a 100 ml con agua.

2 Soluciones diluyentes

Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada).

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
--------------	------------

Fosfato de sodio monobásico	34 gr.
Agua	1 lt.

Preparación:

- Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1,0 N.
- Llevar a un litro con agua.
- Esterilizar durante 15 minutos a $121^{\circ} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.
- Conservar en refrigeración (solución concentrada).
- Tomar 1,25 ml de la solución concentrada y llevar a un litro con agua (solución de trabajo).
- Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera.
- Esterilizar a $121^{\circ} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos.
- Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales.

Agua peptonada

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Peptona	1,0 g
Cloruro de sodio	8,5 g
Agua	1 litro

Preparación:

- Disolver los componentes en un litro de agua.
- Ajustar el pH a $7 \pm 0,1$ con hidróxido de sodio 1,0 N.
- Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera.
- Esterilizar a $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos.
- Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales.
- Si este diluyente no es usado inmediatamente, almacenar en lugar oscuro a una temperatura entre 0 a 5°C por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición.

Procedimiento:

A) Preparación de la dilución primaria.

A partir de muestras líquidas:

- 1.-Para muestras líquidas no viscosas (agua, leche, refrescos, etc.) en las cuales la distribución de microorganismos es homogénea o fácilmente homogeneizable por medios mecánicos (agitación, etc.).
- 2.-Para muestras congeladas de un alimento originalmente líquido o licuable, fundir por completo en baño de agua de 40 a 45°C un tiempo máximo de 15 minutos y homogeneizar agitando vigorosamente.
- 3.-Para la parte líquida de una muestra heterogénea la cual sea considerada suficientemente representativa de la muestra total (por ejemplo la fase acuosa de grasas animales y vegetales).
- 4.- Agitar la muestra manualmente con 25 movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo de 7 segundos. Tomar 1 ml de la muestra y diluir con 9 ml del diluyente el cual debe encontrarse a una temperatura similar a ésta, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente.
- 5.- Siempre que la cantidad de muestra lo permita, tomar alícuotas mayores, por ejemplo volúmenes de 10 u 11 ml, diluidos con 90 o 99 ml, de la misma forma que se describió anteriormente

A partir de muestras sólidas o semisólidas.

- 1.- Las muestras sólidas y semisólidas congeladas, deben descongelarse en refrigeración de 4 a 8°C durante 18 horas y no más de 24 horas antes de proceder a su análisis.
- 2.- Pesar una cantidad de 10 u 11 g de la muestra por analizar en un recipiente o bolsa plástica estériles de tamaño adecuado.
- 3.- Adicionar un volumen de 90 a 99 ml del diluyente llevado a una temperatura similar a la de la muestra.
- 4.- Operar la licuadora o el homogeneizador peristáltico de 1 a 2 minutos hasta obtener una suspensión completa y homogénea según se indique en la técnica correspondiente para cada alimento. Aún en los equipos más lentos, este tiempo no debe exceder de 2,5 minutos.
- 5.- Permitir que las partículas grandes se sedimenten, y transferir la cantidad deseada tomando de las capas superiores de la suspensión.
- 6.-Cuando la dilución primaria es muy viscosa o pegajosa, adicionar más diluyente, lo cual debe tomarse en cuenta para las operaciones subsecuentes o expresión de resultados.
- 7.-El homogeneizador peristáltico (Stomacher) puede no ser adecuado para algunos productos (por ejemplo, aquellos con partículas agudas o constituyentes que no se dispersen fácilmente). Debe

ser utilizado sólo cuando exista evidencia (publicada o por ensayos comparativos) de que los resultados obtenidos no difieren significativamente con aquellos obtenidos con licuadora.

B) Preparación de las diluciones decimales adicionales.

- 1.- Transferir 1 ml o un múltiplo, por ejemplo, 10 u 11 ml de la dilución primaria 1 + 9 (10⁻¹), en otro recipiente conteniendo nueve veces el volumen del diluyente estéril a la temperatura apropiada, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente.
- 2.- Mezclar cuidadosamente cada botella de diluyente siempre de la misma manera que se describe en A inciso 4.
- 3.- La selección de las diluciones que se vayan a preparar y de aquellas que se van a inocular, dependen del número esperado de microorganismos en la muestra, con base a los resultados de análisis previos y de la información que se obtenga del personal de inspección que la haya colectado. En ausencia total de información, trabajar con las diluciones de la primera a la sexta.
- 4.- Utilizar pipetas diferentes para cada dilución inoculando simultáneamente las cajas que se hayan seleccionado. El volumen que se transfiera nunca debe ser menor al 10% de la capacidad total de la pipeta.
- 5.- Si la pipeta es terminal y se transfiere un volumen de líquido equivalente a su capacidad total, escurrir aplicando la punta de la pipeta una sola vez en una área de la caja Petri sin líquido.
- 6.- Mientras se afora el líquido de la pipeta, la punta de ésta debe apoyarse en el interior del cuello del frasco y mantenerla en posición vertical, para lo cual este último debe inclinarse lo necesario.
- 7.-En estudios donde se busca la presencia o ausencia de una determinada especie de microorganismos en 0,1 ml o 0,1 g, no es necesario preparar diluciones mayores.
- 8.-El criterio para seleccionar las diluciones a preparar de acuerdo con el número de microorganismos esperado es:
 - Para la técnica del número más probable utilizar tres tubos: donde sea posible demostrar el microorganismo en 10 ml de la dilución más alta.
 - Para la técnica de cuenta en placa, considerar aquellas en las que se puedan contar de 25 a 250 colonias en un mínimo de una de tres diluciones en el método de cuenta de bacterias aerobias en placa. En el caso de otros grupos microbianos, considerar el número especificado de colonias en la Norma Oficial Mexicana correspondiente.

C) Duración del procedimiento.

En general, las diluciones de la muestra deben ser preparadas inmediatamente antes del análisis y éstas deben ser usadas para inocular el medio de cultivo dentro de los 20 minutos posteriores a su preparación.

Bibliografía

- Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Preparación y Dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

PRACTICA No. 4 MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA

OBJETIVO:

Establecer el método para estimar la cantidad de microorganismos viables presentes en un alimento, por la cuenta de unidades formadoras de colonia en un medio sólido, incubado aeróbicamente.

Introducción:

Cuando se requiere investigar el contenido de microorganismos viables en un alimento, la técnica comúnmente utilizada es la cuenta en placa.

En realidad esta técnica no pretende poner en evidencia todos los microorganismos presentes. La variedad de especies y tipos diferenciables por sus necesidades nutricionales, temperatura requerida para su crecimiento, oxígeno disponible, etc., hacen que el número de colonias contadas constituyan una estimación de la cifra realmente presente y la misma refleja si el manejo sanitario del producto ha sido el adecuado.

Por otra parte el recuento de termofílicos, psicofílicos y psicotróficos es importante para predecir la estabilidad del producto bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

Para obtener resultados reproducibles y por lo tanto significativos, es de suma importancia seguir fielmente y controlar cuidadosamente las condiciones.

Esta técnica puede aplicarse para la estimación de microorganismos viables en una amplia variedad de alimentos.

El fundamento de la técnica consiste en contar las colonias, que se desarrollan en el medio de elección después de un cierto tiempo y temperatura de incubación, presuponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo de la muestra bajo estudio. El método admite numerosas fuentes de variación, algunas de ellas controlables, pero sujetas a la influencia de varios factores.

Aparatos e instrumentos

- Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170 °C
- Autoclave con termómetro y manómetro, calibrada con termómetro de máximas y mínimas.
- Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de 0.1 °C y que mantenga la temperatura a 45 ± 0.5 °C

- Licuadora de una a dos velocidades controladas por un reóstato o bien un homogeneizador peristáltico (Stomacher).
- Vasos para licuadora con tapa esterilizable o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico.
- Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 1,0^{\circ}\text{C}$, provista con termómetro calibrado.
- Contador de colonias de campo obscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador.
- Registrador mecánico o electrónico.
- Microscopio óptico.

Materiales

- Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 ml (o si es necesario de 1 ml y 2 ml), con tapón de algodón. Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.
- Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.
- Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca.
- Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.
- Todo el material e instrumentos que tengan contacto con las muestras bajo estudio deberán esterilizarse mediante:
 - Horno, durante 2 h a 170 a 175°C o 1 h a 180°C o
 - Autoclave, durante 15 minutos como mínimo a $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.
- El material de vidrio puede sustituirse por material desechable que cumpla con las especificaciones deseadas. No debe usarse material de vidrio dañado por esterilización repetida y éste debe ser químicamente inerte.

Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan, deben ser grado analítico.

Cuando se indique agua, debe entenderse agua destilada, con pH cercano a la neutralidad.

1. Medio de Cultivo.

Agar Tripton-Extracto de Levadura (agar para cuenta estándar).

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Extracto de levadura	2,5 g
Triptona	5,0 g
Dextrosa	1,0 g
Agar	15,0 g
Agua	1,0 l

Preparación del medio de cultivo.

- Suspender los componentes del medio deshidratado en un litro de agua. Hervir hasta total disolución.
- Distribuir en recipientes de vidrio esterilizables de capacidad no mayor de 500 ml, cantidades de aproximadamente la mitad del volumen del mismo. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1,0$ °C, durante 15 minutos. El pH final del medio debe ser $7,0 \pm 0,2$ a 25°C.
- Si el medio de cultivo es utilizado inmediatamente, enfriar a $45^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ °C en baño de agua y mantenerlo a esta temperatura hasta antes de su uso. El medio no debe fundirse más de una vez.
- En caso de medios deshidratados seguir las instrucciones del fabricante.
- El medio de cultivo anterior es el de uso más generalizado. Para algunos alimentos en particular se requerirá de un medio de cultivo especial que se debe indicar al describir la técnica para ese alimento.

Preparación de la muestra

Para la preparación de la muestra seguir el procedimiento de: Preparación y dilución de muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

Procedimiento:

- 1.- Distribuir las cajas estériles en la mesa de trabajo de manera que la inoculación; la adición de medio de cultivo y homogenización, se puedan realizar cómoda y libremente. Marcar las cajas en sus tapas con los datos pertinentes previamente a su inoculación y correr por duplicado.
- 2.- Después de inocular las diluciones de las muestras preparadas según la NOM-110-SSA1-1994, Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico, en las cajas Petri, agregar de 12 a 15 ml del medio preparado, mezclarlo mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante,

sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el medio no moje la cubierta de las cajas. Dejar solidificar.

3.- Incluir una caja sin inóculo por cada lote de medio y diluyente preparado como testigo de esterilidad.

4.- El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente hasta que finalmente se adiciona el medio de cultivo a las cajas, no debe exceder de 20 minutos.

5.- Incubar las cajas en posición invertida (la tapa hacia abajo) por el tiempo y la temperatura que se requieran, según el tipo de alimento y microorganismo de que se trate, véase el cuadro 1.

CUADRO 1

Grupo Bacteriano	Temperatura	Tiempo de Incubación
Termofílicos aerobios	55 ± 2°C	48 ± 2 h
Mesofílicos aerobios*	35 ± 2°C	48 ± 2 h
Psicrotróficos	20 ± 2°C	3 - 5 días
Psicrofílicos	5 ± 2°C	7 - 10 días

6.- En la lectura seleccionar aquellas placas donde aparezcan entre 25 a 250 UFC, para disminuir el error en la cuenta.

7.- Contar todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas (excepto las de mohos y levaduras), incluyendo las colonias puntiformes. Hacer uso del microscopio para resolver los casos en los que no se pueden distinguir las colonias de las pequeñas partículas de alimento.

Fórmulas de cálculo para resultados

Cálculo del método.

1.- Después de la incubación, contar las placas que se encuentren en el intervalo de 25 a 250 colonias, usando el contador de colonias y el registrador. Las placas de al menos una de tres diluciones deben estar en el intervalo de 25 a 250. Cuando sólo una dilución está en el intervalo apropiado, véase el cuadro 2, ejemplo 1. Calcular la cuenta promedio por gramo o mililitro de dicha dilución y reportar.

2.- Cuando dos diluciones están en el intervalo apropiado, determinar la cuenta promedio dada por cada dilución antes de promediar la cuenta de las dos diluciones para obtener la cuenta en placa por gramo o mililitro, véase el cuadro 2, ejemplo 2.

3.- Con el fin de uniformar los criterios para el reporte de las cuentas en ensayos donde las placas presenten situaciones no contempladas en los ejemplos anteriores, se presentan las siguientes guías:

I.-Placas con menos de 25 colonias.- Cuando las placas corridas para la menor dilución muestran cuentas de menos de 25 colonias, contar el número de colonias presentes en dicha dilución, promediar el número de colonias y multiplicar por el factor de dilución para obtener el valor estimado de cuenta en placa. Aclarar en su informe esta situación agregando la leyenda "valor estimado", véase el cuadro 2, ejemplo 3.

II.- Placas con más de 250 colonias.- Cuando el número de colonias por placa exceda de 250, contar las colonias en aquellas porciones de la placa que sean representativas de la distribución de colonias. Contar por ejemplo, una cuarta parte o una mitad del área de la caja y multiplicar el valor obtenido por 4 ó 2, respectivamente. Si solamente pueden contarse algunos cuadros, considerar que el fondo de una caja Petri de 100 mm de diámetro contiene 65 cuadros de la cuadrícula del contador. Aclarar en el informe esta situación agregando la leyenda "valor estimado", véase el cuadro 2, ejemplo 4.

III.- Colonias extendidas.- Las colonias extendidas pueden presentarse en las siguientes formas:

a).- Cadenas de colonias no separadas claramente entre sí, que parecen ser causadas por la desintegración de un cúmulo de bacterias.

b).- Colonias que se desarrollan en película entre el agar y el fondo de la caja.

c).- Colonias que se desarrollan en película en la orilla de la caja sobre la superficie del agar.

d).- Colonias de crecimiento extendido y en algunas ocasiones acompañadas de inhibición del crecimiento, que en conjunto exceden el 50% de la caja o represión del crecimiento que por sí mismo excede el 25% de la superficie de la caja.

e).- Cuando es necesario contar en cajas que contienen colonias extendidas que no están incluidas en d), contar cualquiera de los tipos a),b) ó c), como provenientes de una sola fuente. En el caso de las colonias del tipo a), si la caja contiene una sola cadena, contar como una sola colonia, si la caja contiene varias cadenas que parecen originarse de fuentes separadas, contar cada cadena como colonia individual. No contar cada colonia de la cadena individualmente. Las colonias del tipo b) y c) generalmente se observan como crecimiento diferenciable de otras colonias y se cuentan como tales. Los crecimientos tipo d), reportarlos como crecimiento extendido. En caso de que una dilución se encuentre dentro del rango y otra dilución presente colonias de crecimiento extendido, reportar la dilución en la que se pueden contar las colonias, véase el cuadro 2, ejemplo 5

IV.- Placas sin colonias.- Cuando las placas de todas las diluciones no muestran colonias, reportar la cuenta en placa como menor que una vez el valor de la dilución más baja usada, véase el cuadro 2, ejemplo 6.

V.- Placas corridas por duplicado, una con crecimiento dentro del intervalo adecuado y otra con más de 250 colonias.- Cuando una placa tiene entre 25 y 250 colonias y su duplicado más de 250 colonias, contar ambas placas incluyendo la que está fuera del intervalo para determinar la cuenta en placa, véase el cuadro 2, ejemplo 7.

VI.- Placas corridas por duplicado, una placa de cada dilución dentro del intervalo de 25 a 250 colonias.- Cuando una placa dentro de diferentes diluciones contiene el número de colonias especificadas en el intervalo, contar el número de colonias de las cuatro placas para calcular la cuenta en placa, véase el cuadro 2, ejemplo 8.

VII.- Placas corridas por duplicado, ambas placas de una dilución dentro del intervalo de 25 a 250 y sólo una de la otra dilución dentro del mismo. Contar las cuatro cajas incluyendo aquélla con menos de 25 o más de 250 colonias, para calcular la cuenta en placa, véase el cuadro 2, ejemplo 9.

VIII.- Después de contabilizar las colonias en las placas seleccionadas, multiplicar por la inversa de la dilución para obtener el número de UFC por mililitro o gramo de la muestra. Redondear la cifra obtenida en la cuenta de manera que sólo aparezcan dos dígitos significativos al inicio de esta cifra. Para redondear, elevar el segundo dígito al número inmediato superior cuando el tercer dígito de la derecha sea cinco o mayor (por ejemplo: 128 redondear a 130). Si el tercer dígito es cuatro o menos, reemplazar el tercer dígito con cero y el segundo dígito mantenerlo igual (Por ejemplo: 2417 a 2400):

Interpretación de Resultados

Reportar como: Unidades formadoras de colonias, ___ UFC/g o ml, de bacterias aerobias en placa en agar triptona extracto de levadura o agar para cuenta estándar, incubadas _____ horas a _____ °C.

CUADRO 2

Cálculo de los valores de la cuenta en placa
--

(Ensayos por duplicado)				
Ejemplo Número	Colonias contadas			UFC/g o ml
	1:100	1:1000	1:10000	
1	> 250 ^a	178	16	180000
	> 250	190	17	
2	> 250	220	25	250000
		238	28	
3	18	2	0	1600 ^b
	14	0	0	
4	> 250	> 250	512	5000000 ^b
	>250	> 250	495	
5	>250	240	34	290000
	> 250	235	Crecimiento extendido	
6	0	0	0	<100 ^c
7	> 250	240	24	250000
	>250	268	19	
8	> 250	216	23	280000
	>250	262	42	
9	> 250	215	20	230000
	>250	235	26	
	> 250	275	32	270000
	>250	225	26	

^a Cuenta por arriba de 250 colonias.

^b Debe aclararse “valor estimado” por encontrarse los valores fuera del intervalo de 25 a 250.

^c Debe informarse de acuerdo a la menor dilución ensayada y contada, en este caso 1:100

Bibliografía:

-Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

PRACTICA No. 5 MÉTODO PARA LA CUENTA DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES EN PLACA

OBJETIVO:

Establecer el método microbiológico para determinar el número de microorganismos coliformes totales presentes en productos alimenticios por medio de la técnica de cuenta en placa.

Introducción:

El grupo de los microorganismos coliformes es el más ampliamente utilizado en la microbiología de los alimentos como indicador de prácticas higiénicas inadecuadas.

El uso de los coliformes como indicador sanitario puede aplicarse para:

- La detección de prácticas sanitarias deficientes en el manejo y en la fabricación de los alimentos.
- La evaluación de la calidad microbiológica de un producto, aunque su presencia no necesariamente implica un riesgo sanitario.
- Evaluación de la eficiencia de prácticas sanitarias e higiénicas del equipo.
- La calidad sanitaria del agua y hielo utilizados en las diferentes áreas del procesamiento de alimentos.
- La demostración y la cuenta de microorganismos coliformes, puede realizarse mediante el empleo de medios de cultivos líquidos o sólidos con características selectivas o diferenciales.

El método permite determinar el número de microorganismos coliformes presentes en una muestra, utilizando un medio selectivo (agar rojo violeta bilis) en el que se desarrollan bacterias a 35°C en aproximadamente 24 h, dando como resultado la producción de gas y ácidos orgánicos, los cuales viran el indicador de pH y precipitan las sales biliares.

Aparatos e instrumentos

- Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170 °C
- Autoclave con termómetro y manómetro, calibrada con termómetro de máximas y mínimas.
- Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de 0.1 °C y que mantenga la temperatura a 45±0.5 °C
- Licuadora de una a dos velocidades controladas por un reóstato o bien un homogeneizador peristáltico (Stomacher).
- Vasos para licuadora con tapa esterilizable o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico.

- Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 1,0^{\circ}\text{C}$, provista con termómetro calibrado.
- Contador de colonias de campo obscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador.
- Registrador mecánico o electrónico.
- Microscópio óptico.
- Potenciómetro con una escala mínima de 0.1 unidades de pH a 25°C

Materiales

- Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 ml (o si es necesario de 1 ml y 2 ml), con tapón de algodón. Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.
- Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.
- Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca.
- Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.
- Todo el material e instrumentos que tengan contacto con las muestras bajo estudio deberán esterilizarse mediante:
 - Horno, durante 2 h a 170 a 175°C o 1 h a 180°C o
 - Autoclave, durante 15 minutos como mínimo a $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.
- El material de vidrio puede sustituirse por material desechable que cumpla con las especificaciones deseadas. No debe usarse material de vidrio dañado por esterilización repetida y éste debe ser químicamente inerte.

Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan, deben ser grado analítico.

Cuando se indique agua, debe entenderse agua destilada.

Soluciones diluyentes

Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada).

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Fosfato de sodio monopotásico	34 gr.
Agua	1 lt.

Preparación:

- Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1,0 N.
- Llevar a un litro con agua.
- Esterilizar durante 15 minutos a $121^{\circ} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.
- Conservar en refrigeración (solución concentrada).
- Tomar 1,25 ml de la solución concentrada y llevar a un litro con agua (solución de trabajo).
- Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera.
- Esterilizar a $121^{\circ} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos.
- Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales.

Agua peptonada

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Peptona	1,0 g
Cloruro de sodio	8,5 g
Agua	1 litro

Preparación:

- Disolver los componentes en un litro de agua.
- Ajustar el pH a $7 \pm 0,1$ con hidróxido de sodio 1,0 N.
- Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera.
- Esterilizar a $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos.
- Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales.
- Si este diluyente no es usado inmediatamente, almacenar en lugar oscuro a una temperatura entre 0 a 5°C por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición.

Medio de cultivo

Agar-rojo- violeta-bilis-lactosa (RVBA)

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Peptona	7,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Lactosa	10,0 g
Sales biliares	1,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,002 g
Agar	15,0 g
Agua	1,0 l

Preparación:

- Mezclar los componentes en el agua y dejar reposar durante algunos minutos.
- Mezclar perfectamente y ajustar el pH a 7,4 con ácido clorhídrico 0,1N o con hidróxido de sodio 0,1N a 25°C, de forma que después del calentamiento se mantenga en este valor.
- Calentar con agitación constante y hervir durante 2 minutos.
- Enfriar inmediatamente el medio en un baño de agua hasta que llegue a 45°C.
- Evitar el sobrecalentamiento del medio.
- No debe esterilizarse en autoclave.
- Usar el medio dentro de las tres primeras horas después de su preparación.
- En el caso de utilizar medio de cultivo deshidratado, seguir las instrucciones del fabricante.

Preparación de la muestra

La preparación de la muestra debe ser de acuerdo a lo establecido en el procedimiento “Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico”.

Procedimiento

- 1.- Colocar en cajas Petri por duplicado 1 ml de la muestra líquida directa o de la dilución primaria, utilizando para tal propósito una pipeta estéril.
- 2.- Repetir el procedimiento tantas veces como diluciones decimales se requiera sembrar, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución.
- 3.- Vertir de 15 a 20 ml del medio RVBA fundido y mantenido a $45 \pm 1,0^\circ\text{C}$ en baño de agua. En el caso de utilizar cajas de Petri de plástico se vierte de 10 a 15 ml del medio. El tiempo transcurrido

entre la preparación de la dilución primaria y el momento en que se vierte el medio de cultivo, no debe exceder de 20 minutos.

4.- Mezclar cuidadosamente el inóculo con el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, seis movimientos en el sentido contrario al de las manecillas del reloj y seis de atrás para adelante, sobre una superficie lisa y nivelada. Permitir que la mezcla solidifique dejando las cajas Petri reposar sobre una superficie horizontal fría.

5.- Preparar una caja control con 15 ml de medio para verificar la esterilidad.

6.- Después de que está el medio completamente solidificado en la caja, verter aproximadamente 4 ml del medio RVBA a $45 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ en la superficie del medio inoculado. Dejar que solidifique.

7.- Invertir las placas y colocarlas en la incubadora a 35°C , durante 24 ± 2 horas.

8.- Después del periodo especificado para la incubación, contar las colonias con el contador de colonias.

9.- Seleccionar las placas que contengan entre 15 y 150 colonias. Las colonias típicas son de color rojo oscuro, generalmente se encuentran rodeadas de un halo de precipitación debido a las sales biliares, el cual es de color rojo claro o rosa, la morfología colonial es semejante a lentes biconvexos con un diámetro de 0,5 a 2,0 mm.

Fórmulas de Cálculo para Resultados

1.- Placas que contienen entre 15 y 150 colonias características.

Separar las placas que contienen el número antes mencionado de colonias características en dos diluciones consecutivas. Contar las colonias presentes. Calcular el número de coliformes por mililitro o por gramo de producto, multiplicando el número de colonias por el inverso de la dilución correspondiente, tomando los criterios de la NOM-092-SSA1-1994. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa.

2.- Placas que contienen menos de 15 colonias características.

Si cada una de las placas tiene menos de 15 colonias características, reportar el número obtenido seguido de la dilución correspondiente.

3.- Placas con colonias no características.

Si en las placas no hay colonias características, reportar el resultado como: menos de un coliforme por 1/d por gramo, en donde d es el factor de dilución.

Informe de la prueba

1.- Informar: UFC/g o ml en placa de agar rojo violeta bilis, incubados a 35°C durante 24 ± 2 h.

- 2.-En caso de emplear diluciones y no observar crecimiento, informar utilizando como referencia la dilución más baja utilizada, por ejemplo dilución 10^{-1} .
- 3.-En caso de no observar crecimiento en la muestra sin diluir se informa: "no desarrollo de coliformes por ml".

Bibliografía:

Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

PRACTICA No. 6 DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES. TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE

Objetivo:

Establecer el método microbiológico para estimar el número de coliformes presentes en productos alimenticios, por medio del cálculo del número más probable (NMP) después de la incubación a 35° C de la muestra diluida en un medio líquido.

Este procedimiento puede aplicarse a agua potable, agua purificada, hielo y alimentos procesados térmicamente, así como muestras destinadas a evaluar la eficiencia de prácticas sanitarias en la industria alimentaria. Este procedimiento debe seleccionarse cuando la densidad esperada es como mínimo de una bacteria en 10 ml de producto líquido o una bacteria por gramo de alimento sólido.

Cuando la densidad bacteriana sea menor que la aquí citada y si la naturaleza del alimento lo permite, utilizar el método de filtrado de membrana. Si la densidad microbiana se espera sea mayor a 100 por mililitro o gramo de muestra, ampliar el intervalo de diluciones o utilizar el método en placa.

Introducción:

Las bacterias coliformes son un grupo heterogéneo compuesto por varios. Existe poca evidencia que indique que estas bacterias coliformes pertenezcan a un solo género taxonómico.

La falta de certeza en cuanto a su filiación taxonómica y la imprecisa correlación entre los métodos recomendados para la detección de coliformes han presentado problemas. El primero, es que *Escherichia coli* es aceptada como bacteria coliforme, la especie contiene variantes que no producen gas de la lactosa o lo hacen después de 48 horas, por lo que no se les identifica por medio de esta técnica. Segundo, la capacidad de fermentar la lactosa está frecuentemente asociada a genes localizados en plásmidos. Estos determinantes extracromosomales son fácilmente transferidos entre otras bacterias Gram negativas no relacionadas a las coliformes, que pueden, en consecuencia, ser recuperadas en la etapa inicial del análisis. No obstante en la práctica, la técnica ha demostrado su efectividad.

El número de organismos se establece mediante la cuenta de unidades formadoras de colonias (NOM-113-SSA1-1994. Método para la Cuenta de Microorganismos Coliformes Totales en Placa) o el uso de la técnica del número más probable. Esta última, también llamada técnica de dilución en tubo, proporciona una estimación estadística de la densidad microbiana presente con base a que la probabilidad de obtener tubos con crecimiento positivo disminuye conforme es menor el volumen de muestra inoculado.

Aparatos e instrumentos

- Autoclave con termómetro y manómetro, calibrada con termómetro de máximas y mínimas.
- Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de $0,1^{\circ}\text{C}$ y que mantenga la temperatura a $45 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.
- Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g.
- Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 1,0^{\circ}\text{C}$, provista con termómetro calibrado.

Materiales:

- Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 ml (o si es necesario de 1 ml y 2 ml), con tapón de algodón. Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.
- Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca.
- Campanas de fermentación (tubos de Durham)
- Gradillas.
- Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro.
- todo el material que tenga contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse mediante:
 - Horno durante 2 horas a 170 a 175°C o 1 h a 180°C o autoclave, durante 15 minutos como mínimo $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$.
 - el material de vidrio puede sustituirse por material desechable que cumpla con las especificaciones deseadas. No debe usarse material de vidrio dañado por las esterilizaciones repetidas y éste debe ser químicamente inerte.

Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico. Cuando se indique agua debe entenderse como agua destilada con pH cercano a la neutralidad-

Soluciones diluyentes

Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada)

FORMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Fosfato monopotásico 34,0 g

Agua 1,0 l

Preparación:

Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1 N.

Llevar a un litro con agua.

Esterilizar durante 15 minutos a $121 \pm 1,0$ °C.

Conservar en refrigeración (solución concentrada).

Tomar 1,25 ml de la solución concentrada y llevar a un litro con agua.

Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera.

Esterilizar durante 15 minutos a 121 ± 1 °C.

Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

Agua peptonada

FORMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Peptona 1,0 g

Cloruro de sodio 8,5 g

Agua 1,0 l

Preparación:

Disolver los componentes en un litro de agua.

Ajustar el pH a 7,0 con hidróxido de sodio 1 N.

Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera.

Esterilizar durante 15 minutos a $121 \pm 1,0$ °C.

Después de la esterilización los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

Si este diluyente no es usado inmediatamente, almacenar en lugar oscuro a una temperatura entre 0 a 5 °C por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición

Medios de cultivo.

Caldo lactosado (medio de enriquecimiento para agua potable y hielo).

Caldo lauril sulfato triptosa (medio de enriquecimiento selectivo).

Caldo lactosa bilis verde brillante (medio de confirmación).

En el caso del análisis de agua potable y hielo puede utilizarse caldo lactosado o caldo lauril sulfato triptosa con púrpura de bromocresol (concentración 0,01 g/l de medio), como alternativa al uso de campanas de fermentación. Los tubos positivos se manifiestan por el vire del indicador a color amarillo.

1.- Caldo lactosado

CUADRO 1

Ingrediente Medio de Medio de concentración 1,5 concentración sencilla

Extracto de carne	4,5 g	3,0 g
Peptona de gelatina	7,5 g	5,0 g
Lactosa	7,5 g	5,0 g
Agua destilada	1000,0 ml	1000,0 ml

Disolver los ingredientes en 1 litro de agua, calentando si es necesario o el medio completo deshidratado, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ajustar el pH final de tal manera que después de la esterilización éste sea de $6,9 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Distribuir en volúmenes de 10 ml en tubos con dimensiones de 16 x 160 mm el medio de concentración sencilla y de 20 ml en tubos de 20 x 200 mm el medio de concentración 1,5, cada tubo debe tener campana de fermentación.

Esterilizar en autoclave por 15 minutos a $121 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Enfriar rápidamente para evitar una exposición excesiva al calor. El aspecto del caldo es claro y de color beige.

Se puede utilizar una concentración doble del medio de cultivo, en cuyo caso se emplearán 10 ml del caldo preparado, cuando se agreguen 10 ml de la muestra.

2.- Caldo lauril sulfato triptosa.

CUADRO 2

Ingrediente	Medio de concentración 1,5	concentración sencilla
Triptosa	30,0 g	20,0 g
Lactosa	7,5 g	5,0 g
Fosfato dipotásico	4,125 g	2,75 g
Fosfato monopotásico	4,125 g	2,75 g
Cloruro de sodio	7,50 g	5,0 g
Lauril sulfato de sodio	0,15 g	0,1 g
Agua destilada	1000,0 ml	1000,0 ml

Disolver los componentes en 1 litro de agua, calentando si es necesario o el medio de cultivo completo deshidratado, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ajustar el pH de tal manera que después de la esterilización éste sea de $6,8 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Distribuir en volúmenes de 10 ml en tubos con dimensiones de 16 x 160 mm el medio de concentración sencilla y de 20 ml en tubos de 20 x 200 mm el medio de concentración 1,5, cada tubo debe tener campana de fermentación.

Esterilizar en autoclave por 15 minutos a $121 \pm 1,0$ °C.

Se recomienda almacenar el medio una vez preparado.

Las campanas de fermentación no deben de contener burbujas de aire después de la esterilización.

Se puede utilizar una concentración doble del medio de cultivo, en cuyo caso se emplearán 10 ml de caldo preparado, cuando se agreguen 10 ml de muestra.

3.- Caldo lactosa bilis verde brillante

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Peptona	10,0 g
Lactosa	10,0 g
Sales biliares	20,0 g
Verde brillante	0,0133 g
Agua	1,0 l

Disolver los componentes o el medio completo deshidratado en agua, calentar si es necesario.

Ajustar el pH, de tal manera que después de la esterilización éste sea de 7,2 a 25 °C.

Distribuir el medio en cantidades de 10 ml en tubos de 16 X 160 mm conteniendo campana de fermentación.

Esterilizar en autoclave por 15 minutos a $121 \pm 1,0$ °C.

Las campanas de fermentación no deben contener burbujas de aire después de la esterilización.

Preparación de la muestra

Las muestras deben prepararse y diluirse, siempre que sea posible, de acuerdo al procedimiento: Preparación y Dilución de muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

Procedimiento

I.- Para agua potable y hielo

a) Prueba presuntiva

1.- Inoculación. Agitar la muestra. Transferir volúmenes de 10 ml de muestra a cada uno de 5 tubos con 20 ml de caldo lactosado de mayor concentración y 1,0 ml y 0,1 ml de muestra a cada uno de los tubos de las series de 5 respectivamente con 10 ml de caldo lactosado de concentración sencilla o caldo lauril sulfato triptosa con púrpura de bromocresol.

2.- Incubación. Incubar los tubos a 35 °C. Examinar a las 24 ± 2 h y observar si hay formación de gas o la formación de gas no se observa en este tiempo, incubar por 48 ± 2 h.

b).- Prueba confirmativa

De cada tubo que muestre formación de gas, tomar una azada y sembrar en un número igual de tubos con medio de confirmación, caldo lactosa lauril bilis verde brillante. Incubar a $35 \pm 0,5$ °C por 24 ± 2 horas o si la formación de gas no se observa en este tiempo, incubar por 48 ± 2 horas.

En esta Norma Oficial Mexicana, para el análisis de agua potable, agua purificada así como hielo, se emplea la serie de 5 tubos inoculados, 5 tubos con 10 ml, 5 tubos con 1 ml y 5 tubos con 0,1 ml.

II.- Para alimentos.

Preparar suficiente número de diluciones para asegurar que todos los tubos correspondientes a la última dilución rindan un resultado negativo.

a).- Prueba presuntiva

1.- Inoculación. Tomar tres tubos de medio de enriquecimiento de mayor concentración. Usar una pipeta estéril para transferir a cada tubo 10 ml de la muestra si es líquida o 10 ml de la dilución primaria inicial, en el caso de otros productos.

2.- Tomar tres tubos de concentración sencilla del medio selectivo de enriquecimiento. Usar una pipeta estéril para transferir a cada uno de estos tubos 1 ml de la muestra si es líquida o 1 ml de la dilución primaria en el caso de otros productos.

3.- Para las diluciones subsecuentes, continuar como se indica en el párrafo anterior, usando una pipeta diferente para cada dilución. Mezclar suavemente el inóculo con el medio.

4.- Incubación. Incubar los tubos a $35 \pm 0,5$ °C por 24 ± 2 horas y observar si hay formación de gas, en caso contrario prolongar la incubación hasta 48 ± 2 horas.

b) Prueba confirmativa

1.-De cada tubo que muestre formación de gas, tomar una azada y sembrar en un número igual de tubos con medio de confirmación (Caldo EC). Incubar a $35 \pm 0,5$ °C por 24 ± 2 horas o si la formación de gas no se observa en este tiempo, prolongar la incubación por 48 ± 2 horas.

2.- En este procedimiento se considera una combinación de tres tubos por cada dilución de la serie. Para algunos productos y siempre que se requiera una mayor precisión en los resultados, será necesario inocular una serie de cinco o diez tubos.

Interpretación de resultados

Tomar la serie de tubos de la prueba confirmativa que dé formación de gas después del periodo de incubación requerido y buscar el NMP en los cuadros correspondientes.

De la estimación de la densidad microbiana por la técnica del número más probable.

Este método es aplicable a cualquier grupo bacteriano de interés sanitario, especialmente en productos que se encuentran en bajas concentraciones de microorganismos (10 por gramo o ml). Ejemplo: Leche, agua, alimentos; que por su consistencia pueden interferir con la exactitud de la cuenta de Unidades Formadoras de Colonias (U.F.C.).

Fundamento.

Se basa en la dilución de la muestra en tubos múltiples, de tal forma que todos los tubos de la menor dilución sean positivos y todos los tubos de la dilución más alta sean negativos. El resultado positivo se demuestra por la presencia de gas o crecimiento microbiano.

Para obtener el Número Más Probable (NMP) en los resultados se aplica la teoría de la probabilidad, lo cual tiene como condición lo siguiente:

- Una distribución aleatoria de las bacterias que existen en la muestra.
- Las bacterias se encuentran como entidades no agrupadas.
- Los microorganismos presentes en la muestra crecerán en el medio, cuando son incubados y se mantengan en las condiciones adecuadas para su desarrollo.

Si se espera una cuenta microbiana alta, la muestra deberá diluirse para dar cumplimiento a las condiciones. La forma más común de realizar esta prueba es mediante diluciones decimales y usando un inóculo en series de 3, 5 o 10 tubos en serie. A medida que el número de tubos inoculados para cada dilución aumentan se reducen los límites de confianza.

1 Uso de tablas de NMP con 95% de límite de confianza.

Las tablas 1-3 presentan la estimación estadística de los valores del NMP que corresponden al 95% de límite de confianza cuando se utilizan 3, 5 y 10 tubos. Otras combinaciones de resultados positivos y negativos no encontrados en estas tablas, tienen muy baja probabilidad de que se presenten. Si los resultados no están incluidos en las tablas, se deberá repetir la prueba a partir de la muestra original. Si no es posible, el NMP se puede obtener (para las combinaciones de 3 y 5 tubos)

de las tablas 4 y 5; también se puede aplicar una ecuación (véase punto B.2) para obtener el NMP aproximado.

El intervalo del 95% de confianza se interpreta como sigue: si el analista supone que el número real de microorganismos cae dentro de los límites, entonces se asume que será correcto el 95% de las veces.

El valor del NMP tabulado representa un intervalo y no un valor absoluto.

Cuando se preparan más de 3 diluciones de una muestra, el NMP deberá determinarse a partir de tres diluciones consecutivas (usando tablas 1-3). Primero, para todas las diluciones que tengan todos los tubos positivos, seleccionar la dilución mayor. Después usar las 2 siguientes diluciones mayores (A y B en las tablas 6 y 7). Cuando en ninguna de las diluciones probadas hubiera crecimiento en todos los tubos, seleccionar (si es posible) las primeras tres diluciones consecutivas (volumen de muestra) para que la dilución media contenga resultados positivos (C de tablas 6 y 7).

Con frecuencia es necesario el NMP desde el inicio con volúmenes diferentes de los enlistados en las tablas 1-5. Si el volumen de muestra es mayor que 0,01 g multiplicar el NMP enlistado en la tabla por 10. El resultado de una determinación de 5 tubos que dé 3 tubos positivos en 0,01 g; 2 tubos positivos en 0,001 g y 1 tubo positivo en 0,0001 g (3-2-1) leer en la tabla No. 2 como 17 y multiplicar por 10 para así obtener 170 como el NMP actual por gramo de muestra. De igual forma si la cantidad más grande utilizada para la tabla de referencia es 1 g en lugar de 0,1 g, dividir el NMP derivado de la tabla entre 10. Por ejemplo el resultado de la determinación del NMP en 3 tubos para *Salmonella* spp que dé 3 tubos positivos en 1 g; 1 tubo positivo en 0,1 g y ningún positivo en 0,01 g (3-1-0) leer en la tabla No. 1 como 43 y dividir entre 10, lo que da 4,3 como el NMP presuntivo por gramo de muestra.

Un método alternativo para obtener el número más probable es usando la siguiente fórmula:

$(\text{NMP/g de la tabla} - 100) \times \text{factor de dilución del tubo de enmedio} = \text{NMP/g}$

Para calcular el NMP/100 g multiplicar por 100.

2 Cálculo aproximado del NMP y 95% de límite de confianza.

Debido a la inherente complejidad para calcular los límites de confianza del NMP lo más común es el uso de tablas. Generalmente estas tablas están limitadas al uso de 3, 5 y 10 tubos por dilución, incluso usando un método aceptado, pueden presentarse datos irregulares o accidentes de

laboratorio que causan pérdida de 1 o más tubos de dilución. En este caso una serie de diluciones de por ejemplo: 5,4,4 puede dar una lectura de 5-2-0. Para estos casos se puede aplicar una fórmula sencilla, la cual no corresponde exactamente con los resultados obtenidos teóricamente; sin embargo, las desviaciones generalmente son pequeñas, esta fórmula no debe ser aplicada para fines de regulación. La fórmula no restringe el número de tubos o las diluciones y puede aplicarse para todo tipo de pruebas. El cálculo aproximado está dado por la siguiente ecuación:

$$NMP/g = P/(N T)^{1/2}$$

Donde: P es el número de tubos positivos, N es la cantidad total de muestra (g) en todos los tubos negativos y T es la cantidad total de muestra (g) en todos los tubos.

Por ejemplo, considerando que se tuvieron serie de diluciones al doble:

MUESTRA (g)	No. DE TUBOS	No. DE TUBOS POSITIVOS
8	5	5
4	5	4
2	5	2
1	5	0
0,5	5	1
0,25	5	0

El número de tubos positivos es: $\underline{P} = (5 + 4 + 2 + 1) = 12$; $\underline{N} = [(8 \times 0) + (4 \times 1) + (2 \times 3) + (1 \times 5) + (0,5 \times 4) + (0,25 \times 5)] = 18,25$; y $\underline{T} = 5 (8+4+2+1+0,5+0,25) = 78,75$

$$NPM/g = 12 / (18,25 \times 78,75)^{1/2} = 0,32/g \text{ o } 32/100 \text{ g}$$

Los límites de confianza del 95% estimados, pueden obtenerse del antilogaritmo de base 10 con la siguiente ecuación:

$$\log (NMP/g) \pm 1,08 [(\log a)/n]^{1/2}$$

Donde: a es el radio de dilución y n es el número de tubos por dilución. Esta expresión asume que el radio de dilución es diferente de 1:10 (por ejemplo 1:2). Para diluciones de 1:10, la cantidad por restar o sumar deberá ser de $1,14(n)^{1/2}$ para la mejor estimación. Si el número de tubos por dilución (n_i) es desigual (por ejemplo: un accidente de laboratorio) para la dilución k reemplazar n por la expresión n_H (media armónica) por el número de tubos por dilución (n_i).

La media armónica se define como:

$$n_H = k / \sum (1/n_i)$$

k es el número de diluciones. Por ejemplo: Suponiendo que el resultado de 3 diluciones en ni fuera 5-4-4. Por lo tanto $n_H = 3 / [(1/5) + (1/4) + (1/4)]^{1/2} = 3/0,70 = 4,3^1$

Para el ejemplo anterior el NMP con n = 5 y un límite de confianza aproximado de 95% será el siguiente:

$$\log 0,32 \square (1,08) [(\log 2)/5]^{1/2}$$

$$-0,495 \square 0,265$$

entonces el límite inferior es el antilogaritmo (-0,76) = 0.17/g o 17/100 g y el límite inferior es el antilogaritmo (-0,23) = 0,59/g o 59/100 g. Cuando se compara con las tablas el NMP podría ser 0,31/g con límites de confianza de 0,16/g y 0,57/g.

Tabla No. 1 Selección del NMP con un límite de confianza de 95% para la prueba de fermentación utilizando 3 tubos: con porciones de 0,1, 0,01 y 0,001 g (ml) de muestra.

0,1	<u>No. de tubos positivos</u>		<u>95% de límite de confianza</u>		
	0,01	0,001	NMP/g (ml) ^b	Inferior	Superior
0	0	0	<3	-	-
0	1	0	3+	<1	17
1	0	0	4	<1	21
1	0	1	7+	2	27
1	1	0	7	2	28
1	2	0	11+	4	35
2	0	0	9	2	38
2	0	1	14+	5	48
2	1	0	15	5	50
2	1	1	20+	7	60
2	2	0	21	8	62
3	0	0	23	9	130
3	0	1	39	10	180
3	1	0	43	10	210
3	1	1	75	20	280
3	2	0	93	30	380
3	2	1	150	50	500
3	2	2	210+	80	640
3	3	0	240	90	1400

3	3	1	460	100	2400
3	3	2	1100	300	4800
3	3	3	>1100	-	-

^a Los resultados normales, obtenidos en un 95% de las pruebas no están seguidos por un símbolo más (+). Menos del 4% de los resultados de las pruebas obtenidos están marcados por un símbolo más (+). Combinaciones de tubos positivos no encontrados en esta tabla se presentan en menos del 1% de las pruebas y si se presentaran con mayor frecuencia indican un error de técnica o que el valor del número más probable se encuentra en el límite. El NMP de combinaciones que no aparecen en la tabla, se puede obtener por extrapolación a la combinación cercana más elevada.

^b Multiplicar todos los valores de NMP/g (ml) por 100 para expresarlos como NMP/100 g (ml).

Tabla No. 2 Selección del NMP con un límite de confianza de 95% para la prueba de fermentación utilizando 5 tubos: con porciones de 0,1, 0,01 y 0,001 g (ml) de muestra^a.

	<u>No. de tubos positivos</u>			<u>95% de límite de confianza</u>		
	0,1	0,01	0,001	NMP/g (ml) ^b	Inferior	Superior
0	0	0	0	<2	-	-
0	0	0	1	2+	<1	10
0	1	0	0	2	<1	10
1	0	0	0	2	<1	11
1	0	0	1	4+	1	15
1	1	0	0	4	1	15
1	2	0	0	6+	2	18
2	0	0	0	4	1	17
2	0	0	1	7+	2	20
2	1	0	0	7	2	21
2	1	1	1	9+	3	25
2	2	0	0	9	3	25
3	0	0	0	8	3	24
3	0	0	1	11	4	29
3	1	0	0	11	4	30
3	1	1	1	14+	6	35
3	2	0	0	14	6	35
3	2	1	1	17+	7	40

3	3	0	17+	7	41
4	0	0	13	5	38
4	0	1	17	7	45
4	1	0	17	7	46
4	1	1	21	9	55
4	2	0	22	9	56
4	2	1	26+	12	65
4	3	0	27	12	67
4	3	1	33+	15	77
4	4	0	34+	16	80
5	0	0	23	9	68
5	0	1	31	13	110
5	1	0	33	14	120
5	1	1	46	20	150
5	1	2	63+	22	180
5	2	0	49	21	170
5	2	1	70	30	210
5	2	2	94+	40	250
5	3	0	79	30	250
5	3	1	110	40	300
5	3	2	140	60	360
5	4	0	130	50	390
5	4	1	170	70	480
5	4	2	220	100	580
5	4	3	280+	120	690
5	4	4	350+	160	820
5	5	0	240	100	940
5	5	1	350	100	1300
5	5	2	540	220	2000
5	5	3	920	300	2900
5	5	4	1600	600	5300
5	5	5	>1600	-	-

^a Los resultados normales, obtenidos en un 95% de las pruebas, no están seguidos por un símbolo más(+). Menos del 4% de los resultados de las pruebas obtenidos están marcados por un símbolo más (+). Combinaciones de tubos positivos no encontrados en esta tabla se presentan en menos del 1% de las pruebas y si se presentaran con mayor frecuencia indican un error de técnica o que el valor del número más probable se encuentra en el límite. El NMP de combinaciones que no aparecen en la tabla, se pueden obtener por extrapolación a la combinación cercana más elevada.

^b Multiplicar todos los valores de NMP/g (ml) por 100 para expresarlos como NMP/100 g (ml).

Tabla No. 3 Selección del NMP con un límite de confianza de 95% para la prueba de fermentación utilizando 10 tubos: con porciones de 0,1, 0,01 y 0,001 g (ml) de muestra^a.

<u>No. de tubos positivos</u>			<u>95% de límite de confianza</u>		
0,1	0,01	0,001	NMP/g (ml) ^b	Inferior	Superior
0	0	0	<1	-	-
0	0	1	1+	<1	5
0	1	0	1	<1	5
0	2	0	2+	<1	7
1	0	0	1	<1	5
1	0	1	2+	<1	7
1	1	0	2	<1	7
1	2	0	3+	1	8
2	0	0	2	<1	7
2	0	1	3+	1	9
2	1	0	3	1	9
2	1	1	4+	1	10
2	2	0	4	2	10
2	3	0	5+	2	12
3	0	0	3	1	9
3	0	1	4	2	11
3	1	0	4	2	11
3	1	1	5+	2	13
3	2	0	5	2	13
3	2	1	6+	3	14
3	3	0	6+	3	14
4	0	0	4	2	12

4	0	1	6	2	13
4	1	0	6	2	14
4	1	1	7	3	15
4	2	0	7	3	15
4	2	1	8	4	17
4	3	0	8	4	17
4	4	0	9+	5	19
5	0	0	6	2	15
5	0	1	7	3	16
5	1	0	7	3	17
5	1	1	9	4	18
5	2	0	9	4	18
5	2	1	10+	5	20
5	3	0	10	5	20
5	3	1	11+	6	22
5	4	0	11+	6	22
6	0	0	8	3	18
6	0	1	9	4	20
6	1	0	9	4	20
6	1	1	11	5	22
6	2	0	11	5	22
6	2	1	12	6	24
6	3	0	12	6	25
6	3	1	14+	7	27
6	4	0	14+	7	27
6	5	0	15+	8	29
7	0	0	10	5	22
7	0	1	12	6	24
7	0	2	13+	7	27
7	1	0	12	6	25
7	1	1	13	7	27
7	1	2	15+	8	30

7	2	0	13	7	27
7	2	1	15	8	30
7	2	2	17+	9	32
7	3	0	15	8	30
7	3	1	17	9	33
7	4	0	17	9	33
7	4	1	19+	10	36
7	5	0	19+	10	36
8	0	0	13	6	28
8	0	1	15	7	31
8	0	2	17+	8	34
8	1	0	15	7	31
8	1	1	17	9	34
8	1	2	19+	10	37
8	2	0	17	9	35
8	2	1	19	10	38
8	2	2	21+	12	42
8	3	0	19	10	39
8	3	1	21	12	42
8	3	2	24+	13	46
8	4	0	22	12	43
8	4	1	24	13	46
8	5	0	24	13	47
8	5	1	27+	15	51
8	6	0	27+	15	52
9	0	0	17	8	37
9	0	1	19	10	41
9	0	2	22+	11	46
9	1	0	19	10	42
9	1	1	22	11	47
9	1	2	25+	13	52
9	2	0	22	12	47

9	2	1	25	13	53
9	2	2	28+	15	58
9	3	0	25	13	54
9	3	1	29	15	60
9	3	2	32+	18	66
9	4	0	29	16	61
9	4	1	33	18	67
9	4	2	37+	20	74
9	5	0	33	18	69
9	5	1	37	20	76
9	5	2	42+	23	83
9	6	0	38	21	77
9	6	1	43+	24	85
9	7	0	44+	24	87
10	0	0	23	12	58
10	0	1	27	14	67
10	0	2	31+	16	77
10	1	0	27	14	69
10	1	1	32	17	79
10	1	2	38	20	92
10	2	0	33	17	83
10	2	1	39	20	96
10	2	2	50	20	110
10	2	3	50+	30	120
10	3	0	40	20	100
10	3	1	50	20	120
10	3	2	60+	30	130
10	3	3	70+	30	150
10	4	0	50	30	120
10	4	1	60	30	140
10	4	2	70	30	160
10	4	3	80+	40	170

10	5	0	60	30	150
10	5	1	70	40	170
10	5	2	90	40	190
10	5	3	100	50	210
10	6	0	80	40	180
10	6	1	90	50	200
10	6	2	110	50	230
10	6	3	120	60	250
10	6	4	140+	70	270
10	7	0	100	50	220
10	7	1	120	60	250
10	7	2	140	70	280
10	7	3	150	80	310
10	7	4	170+	90	340
10	8	0	130	60	280
10	8	1	150	80	320
10	8	2	170	90	360
10	8	3	200	100	400
10	8	4	220	120	440
10	8	5	250+	140	480
10	9	0	170	90	380
10	9	1	200	100	430
10	9	2	230	120	490
10	9	3	260	140	560
10	9	4	300	160	640
10	9	5	350	180	720
10	9	6	400+	210	820
10	10	0	240	120	610
10	10	1	290	150	750
10	10	2	350	170	910
10	10	3	400	200	1100
10	10	4	500	300	1400

10	10	5	700	300	1700
10	10	6	900	400	2100
10	10	7	1120	600	2700
10	10	8	1160	800	3700
10	10	9	2300	1100	6000
10	10	10	>2300	-	-

^a Los resultados normales, obtenidos en un 95% de las pruebas, no están seguidos por un símbolo más (+). Menos del 4% de los resultados de las pruebas obtenidos están marcados por un símbolo más(+). Combinaciones de tubos positivos no encontrados en esta tabla se presentan en menos del 1% de las pruebas y si se presentaran con mayor frecuencia indican un error de técnica o que el valor del número más probable se encuentra en el límite. El NMP de combinaciones que no aparecen en la tabla, se pueden obtener por extrapolación a la combinación cercana más elevada.

^b Multiplicar todos los valores de NMP/g (ml) por 100 para expresarlos como NMP/100 g (ml).

Tabla No. 4 Número más probable (NMP) para 1g de muestra cuando se usan 3 tubos con porciones de 0,1, 0,01 y 0,001g.

<u>Tubos Positivos</u>				<u>Tubos Positivos</u>				<u>Tubos Positivos</u>				<u>Tubos Positivos</u>			
0,1	0,01	0,001	NMP	0,1	0,01	0,001	NMP	0,1	0,01	0,001	NMP	0,1	0,01	0,001	NMP
0	0	0	<3	1	0	0	3,6	2	0	0	9,1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7,2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7,3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6,1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9,2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6,2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9,3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9,4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	>1100

Tabla No. 5 Número más probable (NMP) para 100 ml de muestra cuando se usan 5 porciones en cada una de 3 diluciones con series geométricas.

No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos			
10	1	0,1		10	1	0,1		10	1	0,1		10	1	0,1		10	1	0,1		10	1	0,1	
Ml	ml	ml	N M P	ml	ml	ml	N M P	ml	ml	ml	N M P	ml	ml	ml	N M P	ml	ml	ml	N M P	ml	ml	ml	N M P
0	0	0		1	0	0	2	2	0	0	4,5	3	0	0	7,8	4	0	0	13	5	0	0	23
0	0	1	1,8	1	0	1	4	2	0	1	6,8	3	0	1	11	4	0	1	17	5	0	1	31
0	0	2	3,6	1	0	2	6	2	0	2	9,1	3	0	2	13	4	0	2	21	5	0	2	43
0	0	3	5,4	1	0	3	8	2	0	3	12	3	0	3	16	4	0	3	25	5	0	3	58
0	0	4	7,2	1	0	4	10	2	0	4	14	3	0	4	20	4	0	4	30	5	0	4	76
0	0	5	9,0	1	0	5	12	2	0	5	16	3	0	5	23	4	0	5	36	5	0	5	95
0	1	0	1,8	1	1	0	4	2	1	0	6,8	3	1	0	11	4	1	0	17	5	1	0	33
0	1	1	3,6	1	1	1	6,1	2	1	1	9,2	3	1	1	14	4	1	1	21	5	1	1	46
0	1	2	5,5	1	1	2	8,1	2	1	2	12	3	1	2	17	4	1	2	26	5	1	2	64
0	1	3	7,3	1	1	3	10	2	1	3	14	3	1	3	20	4	1	3	31	5	1	3	84
0	1	4	9,1	1	1	4	12	2	1	4	17	3	1	4	23	4	1	4	35	5	1	4	110
0	1	5	11	1	1	5	14	2	1	5	19	3	1	5	27	4	1	5	42	5	1	5	130
0	2	0	3,7	1	2	0	6,1	2	2	0	9,3	3	2	0	14	4	2	0	22	5	2	0	49
0	2	1	5,5	1	2	1	8,2	2	2	1	12	3	2	1	17	4	2	1	26	5	2	1	70
0	2	2	7,4	1	2	2	10	2	2	2	14	3	2	2	20	4	2	2	32	5	2	2	95
0	2	3	9,2	1	2	3	12	2	2	3	17	3	2	3	24	4	2	3	38	5	2	3	120
0	2	4	11	1	2	4	15	2	2	4	19	3	2	4	27	4	2	4	44	5	2	4	150
0	2	5	13	1	2	5	17	2	2	5	22	3	2	5	31	4	2	5	50	5	2	5	180
0	3	0	5,6	1	3	0	8,3	2	3	0	12	3	3	0	17	4	3	0	27	5	3	0	79
0	3	1	7,4	1	3	1	10	2	3	1	14	3	3	1	21	4	3	1	33	5	3	1	110
0	3	2	9,3	1	3	2	13	2	3	2	17	3	3	2	24	4	3	2	39	5	3	2	140
0	3	3	11	1	3	3	15	2	3	3	20	3	3	3	28	4	3	3	45	5	3	3	180
0	3	4	13	1	3	4	17	2	3	4	22	3	3	4	31	4	3	4	52	5	3	4	210
0	3	5	15	1	3	5	19	2	3	5	25	3	3	5	35	4	3	5	59	5	3	5	250
0	4	0	7,5	1	4	0	11	2	4	0	15	3	4	0	21	4	4	0	34	5	4	0	130
0	4	1	9,4	1	4	1	13	2	4	1	17	3	4	1	24	4	4	1	40	5	4	1	170
0	4	2	11	1	4	2	15	2	4	2	20	3	4	2	28	4	4	2	47	5	4	2	220
0	4	3	13	1	4	3	17	2	4	3	23	3	4	3	32	4	4	3	54	5	4	3	280
0	4	4	15	1	4	4	19	2	4	4	25	3	4	4	36	4	4	4	62	5	4	4	350
0	4	5	17	1	4	5	22	2	4	5	28	3	4	5	40	4	4	5	69	5	4	5	430

0	5	0	9,4	1	5	0	13	2	5	0	17	3	5	0	25	4	5	0	41	5	5	0	240
0	5	1	11	1	5	1	15	2	5	1	20	3	5	1	29	4	5	1	48	5	5	1	350
0	5	2	13	1	5	2	17	2	5	2	23	3	5	2	32	4	5	2	56	5	5	2	540
0	5	3	15	1	5	3	19	2	5	3	26	3	5	3	37	4	5	3	64	5	5	3	920
0	5	4	17	1	5	4	22	2	5	4	29	3	5	4	41	4	5	4	72	5	5	4	1600
0	5	5	19	1	5	5	24	2	5	5	32	3	5	5	45	4	5	5	81				

Tabla No. 6 Ejemplos para determinar el NMP estimado en series de tres tubos con 1 g (ml) de muestra por tubo.

Ejemplo	Cantidad de muestra (g o ml) ^a					Valores positivos reportados	NMP estimado/g o ml ^b
	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001		
A	3/3	3/3	2/3	0/3	0/3	3-2-0	930
B	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3	3-2-0	9300
C	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0-1-0	30
D	3/3	3/3	2/3	1/3	1/3	3-2-2	2100
E	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3-3-3	>110000

^a Numerador/denominador = número de tubos positivos/número de tubos inoculados.

^b Multiplicar todos los valores de NMP/g (ml) por 100 para expresarlos como NMP/100 g (ml).

Tabla No. 7 Ejemplos para determinar el NMP estimado en series de 5 tubos con 1 g (ml) de muestra por tubo.

Ejemplo	Cantidad de muestra (g o ml) ^a					Valores positivos reportados	NMP estimado/g o ml ^b
	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001		
A	5/5	5/5	2/5	0/5	0/5	5-2-0	490
B	5/5	5/5	5/5	2/5	0/5	5-2-0	4900
C	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0-1-0	20
D	5/5	5/5	3/5	1/5	1/5	5-2-2	1400
E	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5-5-5	>160000

^a Numerador/denominador = número de tubos positivos/número de tubos inoculados.

^b Multiplicar todos los valores de NMP/g (ml) por 100 para expresarlos como NMP/100 g (ml).

Informe de la Prueba

Informar “Número más probable (NMP) de coliformes por gramo o mililitro de muestra”.

En caso de agua informar NMP/ 100 ml.

Bibliografía:

Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Determinación de Bacterias coliformes. Técnica del Número más probable.

Norma Oficial Mexicana NOM145-SSA1-1995, productos cárnicos troceados y curados. Productos cárnicos curados y madurados. Disposiciones y especificaciones sanitarias.

PRACTICA No. 7 MÉTODO PARA LA CUENTA DE MOHOS Y LEVADURAS

Objetivo:

Establecer el método general para determinar el número de mohos y levaduras viables presentes en productos destinados al consumo humano por medio de la cuenta en placa a $25 \pm 1^\circ \text{C}$.

Introducción:

Los mohos y levaduras están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se pueden encontrar formando parte de la flora normal de un alimento, o como agentes contaminantes y en los equipos sanitizados inadecuadamente, provocando el deterioro físicoquímico de éstos, debido a la utilización en su metabolismo de los carbohidratos, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos originando mal olor, alterando el sabor y el color en la superficie de los productos contaminados. Además los mohos y levaduras pueden sintetizar metabolitos tóxicos termorresistente, capaces de soportar algunas sustancias químicas, así como la irradiación y presentan capacidad para alterar sustratos desfavorables, permitiendo el crecimiento de bacterias patógenas.

Es de gran importancia cuantificar los mohos y levaduras en los alimentos, puesto que al establecer la cuenta de estos microorganismos, permite su utilización como un indicador de prácticas sanitarias inadecuadas durante la producción y el almacenamiento de los productos, así como el uso de materia prima inadecuada.

El método se basa en inocular una cantidad conocida de muestra de prueba en un medio selectivo específico, acidificado a un pH 3,5 e incubado a una temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, dando como resultado el crecimiento de colonias características para este tipo de microorganismos.

Aparatos e instrumentos

Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170°C .

Incubadora con termostato que pueda ser mantenido a $25 \pm 1,0^\circ \text{C}$ provista con termómetro calibrado.

Autoclave que alcance una temperatura mínima de $121 \pm 1,0^\circ \text{C}$.

Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de $0,1^\circ \text{C}$ y que mantenga la temperatura a $45 \pm 1,0^\circ \text{C}$.

Contador de colonias de campo oscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador.

Registrador mecánico o electrónico.

Microscopio óptico.

Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH a 25 °C.

Materiales.

- Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 ml (o si es necesario de 1 ml y 2 ml), con tapón de algodón. Pueden utilizarse pipetas graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.
- Cajas Petri.
- Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.
- Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca.
- Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.
- Todo el material e instrumentos que tengan contacto con las muestras bajo estudio, deben esterilizarse mediante:
 - Horno, durante 2 h de 170 a 175°C o por 1h a 180°C o autoclave, durante 15 minutos como mínimo a $121 \pm 1,0^\circ\text{C}$.

Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser de grado analítico y cuando se indique agua debe entenderse como agua destilada.

Medios de cultivo.

Agar papa - dextrosa, comercialmente disponible en forma deshidratada.

Preparación del medio de cultivo.

Seguir instrucciones del fabricante y después de esterilizar, enfriar en baño de agua a $45 \pm 1^\circ\text{C}$, acidificar a un pH de $3,5 \pm 0,1$ con ácido tartárico estéril al 10% (aproximadamente 1,4 ml de ácido tartárico por 100 ml de medio). Después de adicionar la solución, mezclar y medir el pH con potenciómetro. Dejar solidificar una porción del medio. Hacer esto en cada lote de medio preparado.

A fin de preservar las propiedades gelificantes del medio, no calentar después de agregar el ácido tartárico.

Soluciones.

Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada)

FORMULA

INGREDIENTES

CANTIDADES

Fosfato de potasio monobásico

34,0 g

Agua 1,0 l

Preparación:

Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7,2 con hidróxido de sodio 1 N.

Llevar a 1,0 l de agua.

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Conservar en refrigeración (solución concentrada).

Tomar 1,25 ml de la solución concentrada y llevar a 1,0 l con agua (solución de trabajo).

Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera.

Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 minutos.

6.1.2.2 Solución estéril de ácido tartárico al 10%

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Acido tartárico	10,0 g
Agua destilada	100,0 ml

Preparación:

Disolver el ácido en el agua y esterilizar a $121 \pm 1,0^\circ\text{C}$ por 15 minutos o por filtración a través de membrana de 0,45 μm .

Preparación de la muestra

La preparación de la muestra debe ser de acuerdo a lo establecido en la NOM-110-SSA1-1994. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

Procedimiento

- 1.- Colocar por duplicado en cajas Petri 1 ml de la muestra líquida directa o de la dilución primaria, utilizando para tal propósito una pipeta estéril.
- 2.- Repetir el procedimiento tantas veces como diluciones decimales se requiera sembrar, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución.
- 3.- Verter de 15 a 20 ml de agar papa dextrosa acidificado, fundido y mantenido a $45 \pm 1^\circ\text{C}$ en un baño de agua. El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el momento en que es vertido el medio de cultivo, no debe exceder de 20 minutos.
- 4.- Mezclar cuidadosamente el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis en el sentido de las manecillas del reloj, seis en el sentido contrario y seis de atrás para adelante, sobre una superficie lisa. Permitir que la mezcla se solidifique dejando las cajas Petri reposar sobre una superficie horizontal fría.

- 5.- Preparar una caja control con 15 ml de medio, para verificar la esterilidad.
- 6.- Invertir las cajas y colocarlas en la incubadora a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- 7.- Contar las colonias de cada placa después de 3, 4 y 5 días de incubación. Después de 5 días, seleccionar aquellas placas que contengan entre 10 y 150 colonias. Si alguna parte de la caja muestra crecimiento extendido de mohos o si es difícil contar colonias bien aisladas, considerar los conteos de 4 días de incubación y aún de 3 días. En este caso, informar el periodo de incubación de 3 o 4 días en los resultados del análisis.
- 8.- Si es necesario, cuando la morfología colonial no sea suficiente, examinar microscópicamente para distinguir las colonias de levaduras y mohos de las bacterias.

Fórmulas de Cálculo de Resultados

Considerar las cuentas de placas con 10 a 150 colonias como las adecuadas para el informe. Multiplicar por el inverso de la dilución, tomando en consideración los criterios de la NOM-092-SSA1-1994. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa, para la expresión de resultados.

1.- Después de la incubación, contar las placas que se encuentren en el intervalo de 25 a 250 colonias, usando el contador de colonias y el registrador. Las placas de al menos una de tres diluciones deben estar en el intervalo de 25 a 250. Cuando sólo una dilución está en el intervalo apropiado, véase el cuadro 2, ejemplo 1. Calcular la cuenta promedio por gramo o mililitro de dicha dilución y reportar.

2.- Cuando dos diluciones están en el intervalo apropiado, determinar la cuenta promedio dada por cada dilución antes de promediar la cuenta de las dos diluciones para obtener la cuenta en placa por gramo o mililitro, véase el cuadro 2, ejemplo 2.

3.- Con el fin de uniformar los criterios para el reporte de las cuentas en ensayos donde las placas presenten situaciones no contempladas en los ejemplos anteriores, se presentan las siguientes guías:

I.- Placas con menos de 25 colonias.- Cuando las placas corridas para la menor dilución muestran cuentas de menos de 25 colonias, contar el número de colonias presentes en dicha dilución, promediar el número de colonias y multiplicar por el factor de dilución para obtener el valor estimado de cuenta en placa. Aclarar en su informe esta situación agregando la leyenda "valor estimado", véase el cuadro 2, ejemplo 3.

II.- Placas con más de 250 colonias.- Cuando el número de colonias por placa exceda de 250, contar las colonias en aquellas porciones de la placa que sean representativas de la distribución de colonias. Contar por ejemplo, una cuarta parte o una mitad del área de la caja y multiplicar el valor

obtenido por 4 ó 2, respectivamente. Si solamente pueden contarse algunos cuadros, considerar que el fondo de una caja Petri de 100 mm de diámetro contiene 65 cuadros de la cuadrícula del contador. Aclarar en el informe esta situación agregando la leyenda "valor estimado", véase el cuadro 2, ejemplo 4.

III.- Colonias extendidas.- Las colonias extendidas pueden presentarse en las siguientes formas:

a).- Cadenas de colonias no separadas claramente entre sí, que parecen ser causadas por la desintegración de un cúmulo de bacterias.

b).- Colonias que se desarrollan en película entre el agar y el fondo de la caja.

c).- Colonias que se desarrollan en película en la orilla de la caja sobre la superficie del agar.

d).- Colonias de crecimiento extendido y en algunas ocasiones acompañadas de inhibición del crecimiento, que en conjunto exceden el 50% de la caja o represión del crecimiento que por sí mismo excede el 25% de la superficie de la caja.

e).- Cuando es necesario contar en cajas que contienen colonias extendidas que no están incluidas en d), contar cualquiera de los tipos a), b) ó c), como provenientes de una sola fuente. En el caso de las colonias del tipo a), si la caja contiene una sola cadena, contar como una sola colonia, si la caja contiene varias cadenas que parecen originarse de fuentes separadas, contar cada cadena como colonia individual. No contar cada colonia de la cadena individualmente. Las colonias del tipo b) y c) generalmente se observan como crecimiento diferenciable de otras colonias y se cuentan como tales. Los crecimientos tipo d), reportarlos como crecimiento extendido. En caso de que una dilución se encuentre dentro del rango y otra dilución presente colonias de crecimiento extendido, reportar la dilución en la que se pueden contar las colonias, véase el cuadro 2, ejemplo 5

IV.- Placas sin colonias.- Cuando las placas de todas las diluciones no muestran colonias, reportar la cuenta en placa como menor que una vez el valor de la dilución más baja usada, véase el cuadro 2, ejemplo 6.

V.- Placas corridas por duplicado, una con crecimiento dentro del intervalo adecuado y otra con más de 250 colonias.- Cuando una placa tiene entre 25 y 250 colonias y su duplicado más de 250 colonias, contar ambas placas incluyendo la que está fuera del intervalo para determinar la cuenta en placa, véase el cuadro 2, ejemplo 7.

VI.- Placas corridas por duplicado, una placa de cada dilución dentro del intervalo de 25 a 250 colonias.- Cuando una placa dentro de diferentes diluciones contiene el número de colonias

especificadas en el intervalo, contar el número de colonias de las cuatro placas para calcular la cuenta en placa, véase el cuadro 2, ejemplo 8.

VII.- Placas corridas por duplicado, ambas placas de una dilución dentro del intervalo de 25 a 250 y sólo una de la otra dilución dentro del mismo. Contar las cuatro cajas incluyendo aquélla con menos de 25 o más de 250 colonias, para calcular la cuenta en placa, véase el cuadro 2, ejemplo 9.

VIII.- Después de contabilizar las colonias en las placas seleccionadas, multiplicar por la inversa de la dilución para obtener el número de UFC por mililitro o gramo de la muestra. Redondear la cifra obtenida en la cuenta de manera que sólo aparezcan dos dígitos significativos al inicio de esta cifra. Para redondear, elevar el segundo dígito al número inmediato superior cuando el tercer dígito de la derecha sea cinco o mayor (por ejemplo: 128 redondear a 130). Si el tercer dígito es cuatro o menos, reemplazar el tercer dígito con cero y el segundo dígito mantenerlo igual (Por ejemplo: 2417 a 2400):

CUADRO 2

Cálculo de los valores de la cuenta en placa (Ensayos por duplicado)				
Ejemplo Número	Colonias contadas			UFC/g o ml
	1:100	1:1000	1:10000	
1	> 250 ^a	178	16	180000
	> 250	190	17	
2	> 250	220	25	250000
		238	28	
3	18	2	0	1600 ^b
	14	0	0	
4	> 250	> 250	512	5000000 ^b
	>250	> 250	495	
5	>250	240	34	290000
	> 250	235	Crecimiento extendido	

6	0	0	0	<100 ^c
7	> 250	240	24	250000
	>250	268	19	
8	> 250	216	23	280000
	>250	262	42	
9	> 250	215	20	230000
	>250	235	26	
	> 250	275	32	270000
	>250	225	26	

^a Cuenta por arriba de 250 colonias.

^b Debe aclararse “valor estimado” por encontrarse los valores fuera del intervalo de 25 a 250.

^c Debe informarse de acuerdo a la menor dilución ensayada y contada, en este caso 1:100

Interpretación de Resultados

Informar:

Unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro (UFC/g ó ml) de mohos en agar papa-dextrosa acidificado, incubadas a 25±1° C durante 5 días.

Unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro (UFC/g ó ml) de levaduras en agar papa-dextrosa acidificado, incubadas a 25+ 1° C durante 5 días.

Bibliografía

NOM-111-SSA1-1994, Bienes Y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

PRACTICA No. 8 MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN ALIMENTOS.

Objetivo:

Establecer el método microbiológico para determinar la cuenta de Staphylococcus aureus presente en alimentos nacionales o de importación.

Introducción

El crecimiento de Staphylococcus aureus en alimentos tiene gran importancia por tratarse de un microorganismo capaz de producir una poderosa enterotoxina que al ingerirse causa intoxicaciones alimentarias.

Entre las razones para determinar el Staphylococcus aureus en alimentos están:

- Confirmar la presencia de este microorganismo como agente causal de una enfermedad de origen alimentario.
- Determinar si un alimento o ingrediente es fuente potencial de este microorganismo enterotoxigénico.
- Demostrar la contaminación postproceso la cual es usualmente debida a contacto humano o con superficies inadecuadamente sanitizadas.

Los alimentos sujetos a contaminación postproceso con tipos enterotoxigénicos de Staphylococcus aureus representan un riesgo por la ausencia de flora competitiva que normalmente restringe el crecimiento del Staphylococcus aureus y la producción de enterotoxinas.

Este tipo de alimentos se vuelven más peligrosos, si además son sujetos a un inadecuado manejo o son mantenidos a temperaturas de conservación inapropiadas.

Los alimentos perecederos tales como: carnes crudas y procesadas, ensaladas, productos de pastelería y productos de leche, son los más comúnmente asociados con intoxicación estafilocócica

Este método permite hacer una estimación del contenido de Staphylococcus aureus en alimentos, se efectúa directamente en placas de medio de cultivo selectivo y diferencial, con la confirmación mediante las pruebas de coagulasa y termonucleasa.

Este método es adecuado para el análisis de alimentos en los cuales se esperen más de 100 células de Staphylococcus aureus por g.

Aparatos

Horno para esterilizar que alcance 180°C.

Autoclave con termómetro.

Baño de agua con regulador de temperatura de $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Baño de agua con regulador de temperatura de $45 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Balanza con capacidad no mayor de 2,500 g y sensibilidad de 0,1 g.

Incubadora a $35 \pm 1^\circ\text{C}$.

Materiales

Todos los instrumentos que se utilicen para trabajar la muestra deben esterilizarse mediante horno, durante 2 h de 170-175°C o como alternativa en autoclave durante 15 min como mínimo a 121°C ± 1 .

-Cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas y separador de huevo.

-Tubos de cultivo de 16 mm x 150 mm o frascos de 125 a 250 ml de capacidad.

-Tubos de cultivo de 10 mm x 75 mm.

-Cajas Petri de 90 a 100 mm de diámetro.

-Pipetas bacteriológicas de 1 ml y 10 ml de capacidad graduadas en 0,1 ml y 1 ml respectivamente y diámetro de 2 a 3 mm.

-Pipetas Pasteur.

-Probetas.

-Varillas de vidrio de 3,5 mm de diámetro aproximadamente y 20 cm de largo dobladas en ángulo recto.

-Matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio

-Cámara húmeda: consiste en una caja Petri en la cual se coloca una varilla de vidrio en forma de "V" rodeada de algodón humedecido con agua.

Reactivos

En caso de disponerse de fórmulas comerciales deshidratadas, para su preparación se deben seguir las instrucciones impresas en la etiqueta respectiva.

Cuando se mencione agua debe entenderse que se trata de "agua destilada".

Los reactivos a emplear en el método objeto de esta norma deben ser grado analítico.

1 Soluciones diluyentes

Solución reguladora de fosfatos (Solución concentrada)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Fosfato monopotásico	34,0 g
Agua	1,0 l

Preparación

- Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1 N, aforar con agua a 1 l.
- Esterilizar durante 15 min a $121^{\circ}\text{C} \pm 1$, conservar en refrigeración (solución concentrada).
- Tomar 1,25 ml de la solución concentrada y llevar a 1 l con agua (solución de trabajo).
- Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera.
- Esterilizar a $121^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 15 min.
- Después de la esterilización, los volúmenes finales y el pH de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

Agua peptonada

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Peptona	1,0 g
Cloruro de sodio	8,5 g
Agua	1,0 l

Preparación

- Disolver los componentes en un litro de agua.
- Ajustar el pH a 7,0 con solución de hidróxido de sodio 1N.
- Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera.
- Esterilizar a $121^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 15 min.
- Después de la esterilización los volúmenes finales y el pH de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

Medios de cultivo

Medio de Baird-Parker

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Medio base (1)	95,0 ml
Solución de telurito de potasio (2)	1,0 ml
Emulsión de yema de huevo (3)	5,0 ml

Preparación

- Cuando el medio base esté a 45°C, agregar los demás ingredientes y mezclar.
- Colocar de 15 a 20 ml del medio completo, enfriar y dejar solidificar.
- Las placas pueden almacenarse por 48 h a temperatura de 0 a 5°C.

Medio base de Baird-Parker

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Triptona	10,0 g
Extracto de levadura	1,0 g
Extracto de carne	5,0 g
Glicina	12,0 g
Cloruro de litio	5,0 g
Piruvato de sodio	10,0 g
Agar	20,0 g
Agua	1,0 l

Preparación

- Disolver los ingredientes o el agar base en agua y calentar con agitación constante y hervir durante 1 min. Esterilizar a 121°C ±1 durante 15 min.
- Enfriar y mantener el medio a 45°C.

(2) Solución de telurito

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Telurito de potasio	1,0 g
Agua	100,0 ml

Preparación

-Disolver el telurito de potasio en agua y esterilizar.

La solución puede ser almacenada por varios meses a temperatura de 0 a 5°C.

(3) Emulsión de yema de huevo

Preparación

-Lavar con agua y jabón los huevos frescos que sean necesarios y limpiarlos con una solución de tintura de yodo (solución alcohólica al 2%) o sumergirlos en solución de cloruro mercúrico (1:1000). Enjuagar con agua estéril y secar con gasa estéril.

-En campana de flujo laminar o en condiciones asépticas, abrir los huevos y vaciarlos en un separador de claras estéril. Transferir las yemas a una probeta hasta un volumen de 60 ml y completar a 90 ml con solución salina isotónica.

-Verter la emulsión a un matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio estéril y agitar fuertemente para formar la emulsión.

-Filtrar a través de gasa.

Las placas deben utilizarse dentro de las 48 h siguientes a su preparación.

Solución salina isotónica

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Cloruro de sodio	0,85 g
Agua	100,0 ml

Preparación

-Disolver el ingrediente en agua y esterilizar a 121°C ±1 durante 15 min.

Caldo de infusión cerebro-corazón (BHI)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Infusión de cerebro de ternera	200,0 ml
Infusión de corazón de res	250,0 ml
Peptona de gelatina	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Fosfato disódico dodecahidratado	2,5 g
Glucosa	2,0 g
Agua	1,0 l

Preparación

- Disolver los ingredientes en agua y calentar ligeramente si es necesario.
- Distribuir y esterilizar durante 15 min a $121^{\circ}\text{C} \pm 1$.

Acido desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera.

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Acido desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera o equivalente	0,03 g
Agar	1,00 g
Cloruro de calcio anhidro (Solución 0,01 M)	0,10 ml
Cloruro de sodio	1,00 g
Azul de toluidina (Solución 0,1 M)	0,30 ml
Tris-(hidroximetil-aminometano) (Tris solución 0,05 M, pH 9)	100,00 ml

Preparación

- Disolver los ingredientes, excepto el azul de toluidina agitando hasta completar la disolución del ácido desoxirribonucleico y calentar a ebullición.
 - Agregar el azul de toluidina. Distribuir en frascos pequeños con tapón de hule. No es necesario esterilizar.
 - Este medio es estable a temperatura ambiente hasta 4 meses y funciona perfectamente aun después de fundirlo varias veces.
 - Tomar un porta objetos limpio y agregar 3 ml del medio fundido esparciéndolo por la superficie.
 - Cuando el agar solidifique, hacer orificios con la punta de una pipeta Pasteur.
 - Conservar en refrigeración para evitar la deshidratación.
- (a) Solución de cloruro de calcio anhidro 0,01 M
- Cloruro de calcio PM = 110,99
 - Disolver 0,1199 g de cloruro de calcio en 100 ml de agua.
- (b) Solución de azul de toluidina 0,1 M
- Disolver 3,05 g de azul de toluidina en 100 ml de agua.
- (c) Solución amortiguadora 0,05 M Tris-(hidroximetilaminometano)
- (Tris pH 9) PM = 121,1
 - Disolver 6,055 g de Tris en 100 ml de agua.

Reactivo biológico:

Plasma de conejo

-Emplear plasma de conejo deshidratado o rehidratado siguiendo las instrucciones del fabricante y agregar ácido etilendiaminotetracético (EDTA) en solución al 0,1% en plasma rehidratado. Si se utiliza plasma deshidratado diluir con agua estéril en proporción de 1:3.

-Puede emplearse plasma de conejo liofilizado adicionado de EDTA. No debe emplearse sangre citratada.

Preparación de la muestra

La preparación de la muestra se debe realizar de acuerdo a lo establecido en la NOM-110-SSA1-1994 "Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico".

Procedimiento

- 1.- Utilizando diferentes pipetas de 1 ml para cada dilución, depositar 0,1 ml sobre la superficie de las placas de agar Baird-Parker.
- 2.- Distribuir el inóculo sobre la superficie del agar con varillas estériles de vidrio en ángulo recto, utilizando una para cada dilución.
- 3.- Mantener las placas en su posición hasta que el inóculo sea absorbido por el agar.
- 4.- Invertir las placas e incubar de 45 a 48 h a 35°C.
- 5.- Seleccionar las placas que tengan entre 15 y 150 colonias típicas de *Staphylococcus aureus*; si no es posible, seleccionar las placas de las diluciones más altas no obstante tengan más de 150 colonias.
- 6.- Cuando las placas tengan menos de 15 colonias típicas también pueden ser utilizadas y al informe se debe agregar la nota de "valor estimado".
- 7.- Las colonias típicas son negras, circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1 a 2 mm y muestran una zona opaca y un halo claro alrededor de la colonia.
- 8.- Seleccionar las colonias de acuerdo con el siguiente cuadro para realizar las pruebas de coagulasa y termonucleasa:

CUADRO

NUMERO DE COLONIAS SOSPECHOSAS EN PLACA	NÚMERO DE COLONIAS POR PROBAR
Menos de 50	3
51 a 100	5
101 a 150 o más	7

9.- Seleccionar el número de colonias y sembrar cada una en tubos con 0,5 ml de caldo de infusión cerebro-corazón.

10.- Incubar a 35°C durante 24 h.

11.- Inocular en la misma forma cepas conocidas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* como testigos positivo y negativo.

12.- Después del periodo de incubación pasar con una pipeta de 1 ml, 0,3 ml de cada cultivo a otro tubo de 10 mm x 75 mm y conservarlo para la prueba de termonucleasa. El resto del cultivo se usa para la prueba de coagulasa.

13.- Prueba de coagulasa

a.- Agregar a los 0,2 ml del cultivo anterior, 0,2 ml de plasma de conejo diluido volumen a volumen con solución salina estéril.

b.- Incubar en baño de agua de 35 a 37°C y observar durante 6 h a intervalos de 1 h; si no hay formación de coágulo, observar a las 24 h. Considerar positiva la prueba si hay formación de coágulo.

Para comprobar la coagulabilidad del plasma de conejo se añade una gota de cloruro de calcio al 5% a 0,5 ml de plasma reconstituido empleado, formándose un coágulo en 10-15 seg.

14 Prueba de termonucleasa

a.- Calentar durante 15 min, 0,3 ml de cultivo en caldo de infusión cerebro-corazón en baño de agua hirviendo.

b.- Pasar una gota de cada cultivo por medio de una pipeta Pasteur a un orificio del medio, incluye testigo.

c.- Incubar a 35°C en cámara húmeda de 4 a 24 h.

d.- La aparición de un halo color rosa extendido de por lo menos 1 mm alrededor de la perforación se califica como positiva.

Fórmulas de cálculo para resultados

Cálculo

Hacer el cálculo del contenido de microorganismos en el producto tomando en cuenta el número de colonias totales, el número de colonias confirmadas, la dilución y el volumen inoculado (0,1 ml).

Ejemplo 1:

Si la caja tiene 80 colonias en la dilución 1:1000

Se toman 5 colonias para la prueba, de éstas dan 4 positivas, el cálculo es:

$$\frac{80 \times 4}{5} = 64 \times 1000 \times 10 = 640\,000$$

Ejemplo 2:

Si la caja tiene 14 colonias en la dilución 1:10

Se toman 3 colonias para la prueba, de éstas dan 2 positivas, el cálculo es:

$$\frac{14 \times 2}{3} = 9,3 \times 10 \times 10 = 930$$

Interpretación de resultados:

Según ejemplo 1:

Informar como *Staphylococcus aureus* 640 000 UFC/g

Según ejemplo 2:

Informar como *Staphylococcus aureus* 930 UFC/g valor estimado

Si las pruebas confirmativas resultan negativas en todas las colonias probadas, informar como:

0 UFC/g en muestras directas

-10 UFC/g en muestras de dilución 1:10

-100 UFC/g en muestras de dilución 1:100

En la práctica los resultados pueden variar, esto dependerá del técnico que trabaje el método y el grado de confiabilidad del mismo, que en el 95% de los casos es de $\pm 16\%$ a $\pm 52\%$.

Bibliografía

NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.

ACTICA No. 9 MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE SALMONELLA SPP EN ALIMENTOS.

Objetivo:

Establecer un método general para la determinación de Salmonella en alimentos.

Introducción:

Los miembros del género Salmonella han sido muy estudiados como patógenos cuando se encuentran presentes en los alimentos. El control de este microorganismo, tanto por parte de las autoridades sanitarias, como en las plantas procesadoras de alimentos, depende en cierta medida del método analítico utilizado para su detección.

Este microorganismo fue inicialmente identificado en muestras clínicas y los métodos empleados para estos casos se adaptaron posteriormente para su detección en alimentos. Las modificaciones a los métodos consideraron dos aspectos principales, el primero es el debilitamiento o daño a las células bacterianas presentes en un alimento, debido al proceso a que está sujeto (por ejemplo: tratamiento térmico, secado, etc.) y segundo, la variabilidad inherente a la naturaleza del producto bajo estudio.

Para diversos alimentos existen diferentes protocolos para el aislamiento de Salmonella, todos ellos son esencialmente similares en principio y emplean las etapas de preenriquecimiento, enriquecimiento selectivo, aislamiento en medios de cultivo selectivos y diferenciales, identificación bioquímica y confirmación serológica de los microorganismos.

La presente técnica para la detección de Salmonella en alimentos, describe un esquema general que consiste de 5 pasos básicos:

- 1.- Preenriquecimiento, es el paso donde la muestra es enriquecida en un medio nutritivo no selectivo, que permite restaurar las células de Salmonella dañadas a una condición fisiológica estable.
- 2.- Enriquecimiento selectivo, empleado con el propósito de incrementar las poblaciones de Salmonella e inhibir otros organismos presentes en la muestra.
- 3.- Selección en medios sólidos, en este paso se utilizan medios selectivos que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a Salmonella y permite el reconocimiento visual de colonias sospechosas.
- 4.- Identificación bioquímica, este paso permite la identificación générica de los cultivos de Salmonella y la eliminación de cultivos sospechosos falsos.
- 5.- Serotipificación, es una técnica serológica que permite la identificación específica de un cultivo.

Equipo

- Horno para esterilizar que alcance los 180°C
- Incubadora con termostato para evitar variaciones mayores de $\pm 0,1^\circ\text{C}$ y termómetro
- Autoclave con termómetro o manómetro, probado con termómetro de máximas
- Baño maría con termostato y termómetro
- Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g
- Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato, con vasos esterilizables (vidrio o aluminio)
- Mecheros Bunsen o Fisher
- Potenciómetro

Material

- Matraces Erlenmeyer de 500 ml
- Recipientes de boca ancha, de capacidad apropiada para contener las muestras simples y compuestas
- Angulos de vidrio
- Cucharas, bisturís, cuchillos y pinzas
- Tubos de ensaye de 16 x 150 mm y de 20 x 100 mm
- Tubos para serología de 10 x 75 mm o de 13 x 100 mm
- Pipetas bacteriológicas de 10,0 y 5,0 ml, graduadas en 0,1 ml y protegidas con tapón de algodón
- Pipetas de 1 ml, con graduaciones de 0,01 ml
- Cajas de petri estériles de vidrio o desechables
- Rejillas para tubos de ensaye
- Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro
- Papel pH (intervalo de 6-8) con graduaciones máximas de 0,4 unidades de pH para cambios de color
- Todo el material que tenga contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse mediante: Horno, durante 2 horas a 170-175°C o autoclave, durante 15 min como mínimo a $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$

Reactivos

6. Reactivos y materiales

En caso de disponerse de fórmulas comerciales deshidratadas, se deben seguir las instrucciones impresas en la etiqueta respectiva para su preparación.

Las sustancias químicas usadas para preparar los medios de cultivo y los reactivos deben ser grado analítico.

Reactivos

1 Medios de pre-enriquecimiento

Agua de peptona tamponada

Fórmula		
Ingredientes	Cantidades	Unidades
Peptona	10,0	g
Cloruro sódico	5,0	g
Fosfato sódico dibásico	3,5	g
Fosfato potásico monobásico	1,5	g
Agua	1,0	l

Preparación

- Disolver los componentes en agua, calentando si es necesario.
- Ajustar el pH, si es necesario, después de la esterilización a 7,0.
- Distribuir en recipientes de vidrio esterilizables con la capacidad necesaria para obtener las porciones necesarias para la prueba.
- Esterilizar por 20 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

Caldo lactosado

Fórmula		
Ingredientes	Cantidades	Unidades
Extracto de carne	3,0	g
Peptona	5,0	g
Lactosa	5,0	g
Agua destilada	1,0	l

pH final: $6,9 \pm 0,2$

Preparación

- Disolver los ingredientes en agua, calentando a 65°C .
- Distribuir en porciones de 225 ml, en frascos de 500 ml.
- Esterilizar durante 15 min a $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

2.- Caldo de enriquecimiento

Caldo selenito-cistina

Fórmula		
Ingredientes	Cantidades	Unidades
Triptona o polipeptona	5,00	g
Lactosa	4,00	g
Fosfato disódico	10,00	g
Selenito ácido de sodio	4,00	g
L-cistina	0,01	g
Agua destilada	1,00	l

pH final: $7,0 \pm 0,2$ a 25°C

Preparación

- Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada estéril y distribuir en volúmenes de 10 y 225 ml en recipientes estériles, según se requiera.
- El caldo así preparado es transparente. De preferencia usarlo el mismo día de su preparación.
- Si se desea conservar el medio por varios días, puede exponerse al calor en autoclave por 5 min a $110^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, tomando entonces un color salmón.

Caldo tetracionato

Fórmula		
Ingredientes	Cantidades	Unidades
Proteosa peptona o triptona	5,0	g
Sales biliares	1,0	g
Carbonato de calcio	10,0	g
Tiosulfato de sodio pentahidratado	30,0	g
Agua destilada	1,0	l

pH final: $7,0 \pm 0,1$

Preparación

- Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada estéril.
- Distribuir, agitando constantemente, en porciones de 10 y 225 ml, en recipientes estériles. Guardar en refrigeración.
- Antes de usar el medio, agregar 2 ml de una solución yodo-yoduro y 1 ml de solución de verde brillante

al 0,1% por cada 100 ml de caldo. El medio una vez adicionado de yodo no debe calentarse y debe usarse el mismo día de su preparación.

Vassiliadis-Rappaport

Fórmula

Solución A

Ingredientes	Cantidades	Unidades
Triptona	5,0	g
Cloruro de sodio	8,0	g
Fosfato de potasio dihidrogenado	1,6	g
Agua destilada	1,0	l

Disolver los componentes en agua por calentamiento cercano a 70°C.

Solución B

Ingredientes	Cantidades	Unidades
Cloruro de magnesio hexahidratado	400,0	g
Agua destilada	1,0	l

-Disolver el cloruro de magnesio en agua.

-Como esta sal es muy higroscópica es conveniente disolver el contenido entero de cloruro de magnesio desde un recipiente recientemente abierto de tal modo que la concentración de la solución sea de 0,4 g/ml.

-Conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

Solución C

Ingredientes	Cantidades	Unidades
Oxalato de verde de malaquita	0,4	g
Agua destilada	100,0	ml

-Disolver el oxalato de verde de malaquita en agua.

-Conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

-Medio completo

Ingredientes	Cantidades	Unidades
solución A	1000	ml
solución B	100	ml
solución C	10	ml

Preparación

- Adicionar 1 000 ml de la solución A, 100 ml de la solución B y 10 ml de la solución C.
- Ajustar el pH si es necesario, de tal manera que después de la esterilización sea de 5,2.
- Distribuir antes de usar dentro de tubos en cantidades de 10 ml.

Almacenar en refrigeración.

Caldo de soya tripticasa

Fórmula		
Ingredientes	Cantidades	Unidades
Tripticasa o triptosa	17,0	g
Fitona	3,0	g
Glucosa	2,5	g
Cloruro de sodio	2,5	g
Agua destilada	1,0	l

pH final: $7,3 \pm 0,2$

Preparación

- Disolver los ingredientes en 1 litro de agua destilada, calentando lentamente hasta su disolución completa.
- Distribuir porciones de 225 ml dentro de matraces de 500 ml y esterilizar en autoclave durante 15 min a $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Leche descremada reconstituida

- Suspender 100 g de leche descremada en polvo en un litro de agua destilada.
- Agitar circularmente hasta disolución. Distribuir en volúmenes de 225 ml en matraces Erlenmeyer de 500 ml. Esterilizar a $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 15 min. El volumen final debe corregirse para mantener 225 ml.

Caldo soya tripticasa estéril adicionado con sulfito de potasio

Adicionar al caldo soya tripticasa 5 g de sulfito de potasio por cada 1000 ml de medio, quedando una concentración final de sulfito de potasio del 0,5%. Adicionar el sulfito de potasio antes de esterilizar en autoclave en la forma habitual.

Medios de aislamiento

Agar verde brillante (VB)

Fórmula		
Ingredientes	Cantidades	Unidades
Extracto de levadura	3,0000	g

Polipeptona (Proteosa peptona No. 3)	10,0000	g
Cloruro de sodio	5,0000	g
Lactosa	10,0000	g
Sacarosa	10,0000	g
Rojo de fenol	0,0800	g
Agar	20,0000	g
Verde brillante	0,0125	g
Agua destilada	1,0000	l

pH final: $6,9 \pm 0,2$

Preparación

-Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada y calentar a ebullición, hasta disolución completa. Ajustar el pH.

-Esterilizar en autoclave por 15 min a $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. El sobrecalentamiento del medio disminuye su selectividad.

-Enfriar el medio a 50°C y distribuirlo en cajas de petri estériles. El aspecto del medio es oscuro, de color marrón.

Agar con sulfito de bismuto

Ingredientes	Cantidades	Unidades
Extracto de carne de res	5,000	g
Mezcla de peptonas	10,000	g
Glucosa	5,000	g
Fosfato disódico (anhidro)	5,000	g
Sulfato ferroso (anhidro)	0,300	g
Sulfito de bismuto	8,000	g
Verde brillante	0,025	g
Agar	20,000	g
Agua destilada	1,000	l

pH final: $7,6 \pm 0,2$

Preparación

-Suspender los ingredientes en un litro de agua. Calentar hasta su disolución completa, agitando frecuentemente. Ajustar el pH.

-Enfriar a 45°C y verter en cajas de petri estériles, distribuyendo de manera homogénea el precipitado propio del medio.

-El aspecto de las placas es opaco, de color verde pálido y deben usarse el mismo día de su preparación. Si la coloración es parda, no deben utilizarse.

-El medio no debe esterilizarse en autoclave; el sobrecalentamiento afecta su selectividad.

Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
Xilosa	3,75	g
L-lisina	5,00	g
Lactosa	7,50	g
Sacarosa	7,50	g
Cloruro de sodio	5,00	g
Extracto de levadura	3,00	g
Rojo de fenol	0,08	g
Agar	15,00	g
Desoxicolato de sodio	2,50	g
Citrato férrico-amónico	0,80	g
Tiosulfato de sodio	6,80	g
Agua destilada	1,00	l

pH final: $6,9 \pm 0,2$

Preparación

-Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada, y calentar en baño de agua a 55°C, agitando frecuentemente, hasta disolución completa. Ajustar el pH.

-Enfriar a 50°C y verter en cajas de petri estériles. No se esterilice.

-El sobrecalentamiento produce una precipitación; la reactividad del medio puede ser satisfactoria, pero las colonias suelen ser muy pequeñas.

-El aspecto del medio es claro y de color rojo brillante.

Agar para Salmonella y Shigella (SS)

Fórmula		
Ingredientes	Cantidades	Unidades
Extracto de carne	5,000	g
Polipeptona	5,000	g
Lactosa	10,000	g
Sales biliares	8,500	g
Citrato de sodio dihidratado	8,500	g
Tiosulfato de sodio pentahidratado	8,500	g
Citrato férrico	1,000	g
Agar	13,500	g
Rojo neutro	0,025	g
Verde brillante	0,330	mg
Agua destilada	1,000	l

pH final: $7,0 \pm 0,2$

Preparación

-Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada estéril y calentar a ebullición hasta disolución completa. Ajustar el pH. No esterilizar en autoclave.

-Enfriar a 50°C y distribuir en cajas de petri estériles en condiciones asépticas.

-El aspecto del medio fundido es claro y de color rosado.

Agar entérico Hektoen

Fórmula		
Ingredientes	Cantidades	Unidades
Proteosa peptona	12,000	g
Extracto de levadura	3,000	g
Lactosa	12,000	g
Sacarosa	12,000	g
Salicina	2,000	g
Sales biliares	9,000	g
Cloruro de sodio	5,000	g
Tiosulfato de sodio	5,000	g
Citrato amónico férrico	1,500	g

Azul de bromotimol	0,064	g
Fuscina ácida	0,100	g
Agar	13,500	g
Agua	1,000	l

pH final: $7,5 \pm 0,2$

Preparación

-Suspender los ingredientes en agua destilada, hervir con agitación hasta completa disolución del agar.No sobrecalentar.

-Dejar enfriar a 55-60°C y distribuir en cajas de petri estériles en condiciones asépticas.

Medios para pruebas bioquímicas

6.1.4.1 Agar de tres azúcares y hierro (TSI)

Fórmula		
Ingredientes	Cantidades	Unidades
Peptona de carne	1,0	g
Peptona de caseína	1,0	g
Cloruro de sodio	0,5	g
Lactosa	1,0	g
Sacarosa	1,0	g
Glucosa	0,1	g
Agar	1,3	g
Rojo de fenol	2,5	mg
Sulfato ferroso amónico pentahidratado	20,0	mg
Tiosulfato de sodio	20,0	mg
Agua destilada	100,0	ml

pH final: $7,3 \pm 0,2$

Preparación

-Suspender los ingredientes en 100 ml de agua destilada. Calentar a ebullición, agitando ocasionalmente, hasta disolución completa.

-Enfriar a 60°C y ajustar el pH.

-Distribuir en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar a $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. Inclinarse los tubos de manera que el medio de cultivo en el fondo alcance una altura de 3 cm y una profundidad de 4 cm. El medio es de color rojo.

Agar de hierro y lisina (LIA)

Fórmula

Ingredientes Cantidades Unidades

Peptona de gelatina 0,5 g

Extracto de levadura 0,3 g

Glucosa 0,1 g

L-lisina 1,0 g

Citrato férrico-amónico 50,0 mg

Tiosulfato de sodio anhidro 4,0 mg

Púrpura de bromocresol 2,0 mg

Agar 1,5 g

Agua destilada 100,0 ml

pH final: $6,7 \pm 0,2$

Preparación

-Suspender los ingredientes en el agua destilada y mezclar bien, calentar hasta ebullición con agitación frecuente hasta conseguir la disolución completa. Ajustar el pH.

-Distribuir en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm, con tapón de rosca.

-Esterilizar en autoclave a $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 12 min. Dejar que los tubos se enfríen en posición inclinada, de tal modo que se obtengan columnas de medio de 4 cm y una superficie inclinada de 2 cm.

-El medio ya preparado es de color púrpura.

Agar nutritivo

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
Extracto de carne	3,0	g
Peptona	5,0	g
Agar	15,0	g
Agua destilada	1,0 l	

pH final: $6,8 \pm 0,2$

Preparación

- Suspender los ingredientes en agua. Dejar reposar de 5 a 10 min.
- Calentar a ebullición hasta disolución completa. Distribuir en tubos de 13 x 100 mm, en cantidades de 1/3 de su volumen.
- Esterilizar a $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 15 min. Inclinar los tubos antes que el agar solidifique.

Medio de SIM (para Sulfuro, Indol y Movilidad)

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
Extracto de carne	3,000	g
Peptona	30,000	g
Hierro peptonizado	0,200	g
Tiosulfato de sodio	0,025	g
Agua destilada	1,000	l

pH final: $7,3 \pm 0,2$

Preparación

- Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta lograr una disolución completa.
- Enfriar a 50°C y ajustar el pH.
- Distribuir el medio en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave a $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. Se dejan enfriar los tubos en posición vertical.

Agar citrato de Simmons

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
Fosfato de amonio	1,00	g
Fosfato dipotásico	1,00	g
Cloruro de sodio	5,00	g
Citrato de sodio	2,00	g
Sulfato de magnesio	0,20	g
Azul de bromotimol	0,08	g
Agar	15,00	g
Agua destilada	1,00	l

pH final: $6,8 \pm 0,2$

Preparación

-Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta lograr una disolución completa.

-Ajustar el pH.

-Distribuir el medio en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave a $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 min.

Dejar enfriar los tubos en posición inclinada.

Caldo MR-VP (Rojo de metilo-Voges Proskauer)

	Fórmula	
Ingredientes	Cantidades	Unidades
Peptona	7,0	g
Dextrosa	5,0	g
Difosfato de potasio	5,0	g
Agua destilada	1,0	l

pH final: $6,9 \pm 0,2$

Preparación

-Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta lograr una disolución completa.

-Ajustar el pH.

-Distribuir el medio en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave a $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 min.

Caldo manitol

	Fórmula	
Ingredientes	Cantidades	Unidades
Extracto de carne	1,000	g
Proteosa peptona	10,000	g
Cloruro de sodio	5,000	g
Rojo de fenol	0,018	g
Manitol	10,000	g
Agua	1,000 l	

pH final: $7,4 \pm 0,2$

Preparación

- Suspender 26 g del medio deshidratado en un litro de agua, mezclar y ajustar el pH.
- Distribuir en volúmenes de 2 a 3 ml en tubos de 13 x 100 mm.
- Esterilizar a $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 min.

Caldo malonato

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
Extracto de levadura	1,000	g
Sulfato de amonio	2,000	g
Fosfato dipotásico	0,600	g
Fosfato monopotásico	0,400	g
Cloruro de sodio	2,000	g
Malonato	3,000	g
Glucosa	0,250	g
Azul de bromotimol	0,025	g
Agua	1,000	l

pH final: $6,7 \pm 0,2$

Preparación

- Suspender los ingredientes en agua, mezclar y ajustar el pH.
- Distribuir en tubos de 13 x 100 mm en cantidades de 3 ml.
- Esterilizar en autoclave a $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 min.

Caldo urea

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
Urea	20,00	g
Extracto de levadura	0,10	g
Fosfato monopotásico	9,10	g
Fosfato disódico	9,50	g
Rojo de fenol	0,01	g
Agua	1,00	l

pH final: $6,8 \pm 0,2$

Preparación

- Disolver los ingredientes en agua destilada.

-NO CALENTAR. Esterilizar por filtración a través de membrana 0,45 μm o en autoclave de 5 a 8 lb de presión durante 15 min.

-Distribuir asépticamente de 1,5 a 3 ml en tubos estériles de 13 x 100 mm.

Caldo de urea rápido

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
Urea	20,000	g
Extracto de levadura	0,100	g
Fosfato monopotásico	0,091	g
Fosfato disódico	0,095	g
Rojo de fenol	0,010	g
Agua	1,000	l

pH final: $6,8 \pm 0,2$

Preparación

-Disolver los ingredientes en agua destilada.

-NO CALENTAR. Esterilizar por filtración a través de membrana 0,45 μm .

-Distribuir asépticamente de 1,5 a 3 ml en tubos estériles de 13 x 100 mm.

Caldo infusión cerebro corazón

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
Infusión cerebro corazón	200,0	g
Infusión de corazón de res	250,0	g
Proteosa peptona	10,0	g
Cloruro de sodio	5,0	g
Fosfato disódico dodecahidratado	2,5	g
Dextrosa	2,0	g
Agua destilada	1,0	l

pH final: $7,4 \pm 0,2$

Preparación

-Disolver los ingredientes en agua destilada, calentar suavemente.

-Distribuir y esterilizar a $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min.

4.- Soluciones

Solución verde brillante al 0,1% (1:1000)

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
Verde brillante	0,1	g
Agua destilada estéril	100,0	ml

Disolver 0,1 g de verde brillante en agua destilada estéril hasta completar 100 ml.

Solución de yodo-yoduro

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
Cristales de yodo	6,0	g
Yoduro de potasio	6,0	g
Agua destilada	100,0	ml

-Disolver los cristales y el yoduro de potasio en agua destilada hasta completar 100 ml.

-Conservar en frasco ámbar.

Solución salina al 0,85%

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
Cloruro de sodio	0,85	g
Agua destilada	100,00	ml

Disolver el cloruro de sodio en el agua y esterilizar a $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 min.

Solución salina formalizada

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
Solución de formaldehído (36-38%)	6,0	ml
Cloruro de sodio	8,5	g
Agua destilada	1,0	l

-Disolver 8,5 g de cloruro de sodio en 1 litro de agua destilada. Esterilizar a $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 min.

-Enfriar a temperatura ambiente. Adicionar 6 ml de la solución de formaldehído. No esterilizar después de la adición de formaldehído.

Reactivo de Kovac

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
p-dimetil-aminobenzaldehído	5,0	g
Alcohol amílico	75,0	ml
Acido clorhídrico concentrado	25,0	ml

-Disolver el p-dimetil-aminobenzaldehído en el alcohol amílico y después agregar el ácido clorhídrico lentamente. Conservar en frasco ámbar en refrigeración.

Solución de alfa-naftol al 5%

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
Alfa-naftol	5,0	g
Alcohol	100,0	ml

-Disolver 5 g de alfa-naftol en alcohol hasta completar 100 ml.

Solución de rojo de metilo

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
Rojo de metilo	0,10	g
Alcohol etílico	300,00	ml
Agua destilada c.b.p.	500,00	ml

-Disolver el rojo de metilo en el alcohol etílico y adicionar agua hasta completar 500 ml.

Solución de hidróxido de potasio al 40%

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
Hidróxido de potasio	40,0	g
Agua destilada	100,0	ml

-Disolver 40 g de hidróxido de potasio en agua hasta completar 100 ml.

Solución de gelatinasa al 5%

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
Gelatinasa	5,0	g
Agua	100,0	ml

-Disolver 5 g de gelatinasa en 100 ml de agua destilada. NO CALENTAR.

Antisueros

Antisuero polivalente somático (O)

Antisuero polivalente flagelar (H)

Antisuero Vi

Procedimiento

Preparación de los alimentos para el aislamiento de Salmonella

Los siguientes métodos se basan en el análisis de 25 g de la muestra analítica en una proporción de 1:9 de muestra/caldo. Esta cantidad puede variarse siempre que se mantenga la misma proporción. Se recomienda una muestra de 25 g o más.

1.1 Procedimiento general para la preparación de muestras

Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un vaso estéril de licuadora o en bolsa estéril para trabajar en homogeneizador peristáltico (stomacher). Adicionar 225 ml del medio de preenriquecimiento estéril (generalmente caldo lactosado, a menos que se indique otro) y licuar si es necesario durante un min. Transferir asépticamente la mezcla homogeneizada a un recipiente estéril de boca ancha con tapón de rosca y dejar reposar por 60 min a temperatura ambiente con la tapa bien enroscada. Mezclar bien y determinar el pH aproximado con papel pH. Ajustar, si es necesario, a un pH $6,8 \pm 0,2$ con hidróxido de sodio 1N o ácido clorhídrico 1N estériles. Mezclar y cubrir el recipiente enroscando suavemente la tapa.

Incubar 24 ± 2 h a 35°C . Continuar como se indica en 8.2.1.

1.2 Procedimiento específico para la preparación de muestra según el producto

1.2.1 Huevo en polvo, claras de huevo en polvo, yema de huevo en polvo, huevos líquidos pasteurizados y congelados, fórmulas infantiles y mezclas preparadas en polvo (harinas para hot cakes, galletas, donas, bisquets y pan).

De preferencia no descongelar la muestra. Si se requiere, preparar los alimentos congelados justo antes de tomar la muestra analítica descongelándolos a 45°C por 15 min aproximadamente con agitación constante en un baño de agua o por 18 h a una temperatura entre $2-5^{\circ}\text{C}$. Los productos que no son en polvo se trabajan como indica el procedimiento general (8.1.1). Para los productos en polvo, pesar 25 g de muestra analítica en el medio de preenriquecimiento, dejando que el polvo se humecte lentamente. Si es necesario homogeneizando poco a poco con una varilla de vidrio estéril u otra herramienta también estéril. Continuar igual que el procedimiento general.

1.2.2 Productos no pasteurizados congelados de huevo

Descongelar la muestra como se indica en 8.1.2.1 Pesar asépticamente y por duplicado 25 g de muestra. Colocar en un matraz con 225 ml de caldo selenito cistina una de las muestras y la otra en un matraz con 225 ml de caldo tetracionato, sin verde brillante. Proceder como en 8.1.1 hasta ajustar el pH. Adicionar 2,25 ml de verde brillante al 0,1% y 4,5 ml de solución yodo-yoduro a la muestra contenida en el caldo tetracionato y mezclar bien. Incubar como se indica en 2.2.

1.2.3 Productos que contienen huevo en su formulación (pastas para sopa, rollos chinos, etc.); ensaladas preparadas (jamón, huevos, pollo, atún, pavo); frutas frescas, congeladas o secas; crustáceos (camarones, cangrejos, jaibas, langostinos, langostas) y pescado.

Preferentemente no descongelar la muestra antes de su análisis, si esto es necesario, proceder igual que en 1.2.1 utilizando caldo lactosado como medio de preenriquecimiento, licuar dos min. Continuar después de la incubación como en 2.1.

1.2.4 Leche en polvo, entera, semidescremada o descremada

Seguir el procedimiento general para el pesado de la muestra y adicionarla lentamente a un matraz Erlenmeyer con 225 ml de solución verde brillante al 0,1%, procurando que el polvo quede en la superficie del líquido y se hidrate suavemente. Dejar la mezcla en reposo por 60 min, e incubar como se indica en 1.1.

1.2.5 Queso

Proceder igual que en 1.1 utilizando agua de peptona tamponada como medio de preenriquecimiento.

1.2.6 Caseína

Seguir el procedimiento señalado en 1.1, licuar por dos min y ajustar cuidadosamente el pH.

1.2.7 Coco

Proceder como se indica en 8.1.1 hasta ajustar, si es necesario, el pH a los valores indicados. Adicionar hasta un máximo de 2,25 ml de Tergitol aniónico 7 estéril ($121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}/15$ min) y mezclar bien. Puede utilizarse Tritón X-100 estéril. Usar la cantidad necesaria de estos detergentes utilizando el volumen mínimo para que se inicie la formación de espuma. Puede ser, para el Tritón X-100 de dos a tres gotas. Incubar como se indica en 1.1.

1.2.8 Levadura seca

Seguir el procedimiento de 8.1.1, utilizando como medio de enriquecimiento caldo soya tripticasa estéril. Mezclar para formar una suspensión homogénea. Ajustar el pH y terminar el procedimiento como en 1.1.

Para levadura seca inactiva, continuar como en 2.1. Para levadura seca activa, mezclar la muestra incubada y transferir 1 ml a cada tubo de 10 ml de caldo tetrionato y 10 ml de caldo lauril triptosa. Incubar los medios selectivos por 24 ± 2 h. Continuar como se indica en 2.2.

1.2.9 Carnes, sustitutos de carnes, derivados cárnicos, sustancias de origen animal, productos glandulares y harinas (pescado, carne y hueso).

1.2.9.1 Productos procesados térmicamente y productos secos. Se sigue el procedimiento señalado en 1.1 hasta la homogeneización. Si la muestra es en polvo o molida, el licuado puede omitirse.

Después de reposar, mezclar bien y ajustar el pH como se indica en el procedimiento general. Para emulsionar las grasas, agregar los detergentes en las mismas proporciones y con las mismas recomendaciones que para el coco. La cantidad de los mismos dependerá en gran medida de la composición del alimento. Los detergentes no serán necesarios en los productos glandulares en polvo. Incubar las muestras como se indica en 1.1.

1.2.9.2 Productos crudos o altamente contaminados. Pesar porciones de 25 g de producto en dos vasos para licuadora. Si la muestra es en polvo o molida, el licuado puede omitirse y el producto puede pesarse directamente en matraces Erlenmeyer estériles de 500 ml. Adicionar 225 ml de caldo selenito cistina o 225 ml de caldo tetrionato (sin verde brillante) a cada muestra analítica. Licuar por dos min y pasar asépticamente a matraces Erlenmeyer de 500 ml. Dejar reposar y ajustar el pH como se indica en 1.1.

Adicionar 2,25 ml de solución de verde brillante 0,1% y 4,5 ml de solución yodo-yoduro a la muestra que se enriquecerá con caldo tetrionato. Homogeneizar e incubar. Continuar como se indica en 2.1.

1.2.10 Dulces y dulces cubiertos (incluyendo chocolate)

Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un vaso para licuadora agregando 225 ml de leche descremada reconstituida. Licuar por dos min. Manejar igual que en 8.1.1 hasta después de ajustar el pH. Adicionar 0,45 ml de la solución verde brillante al 0,1% y mezclar bien. Incubar como se indica en 1.1.

1.2.11 Especias

1.2.11.1 Pimienta negra, pimienta blanca, semilla de apio, comino, perejil seco, romero, tomillo, chile en polvo, paprika o pimentón, ajonjolí, hojuelas de vegetales (vegetales secos).

Pesar asépticamente 25 g de la muestra y verter en un recipiente de tapón de rosca de 500 ml con 225 ml de caldo soya tripticasa estéril y mezclar bien. Continuar con el procedimiento 8.1.1.

1.2.11.2 Ajo en polvo u hojuelas; cebolla en polvo u hojuelas

Pesar asépticamente 25 g de la muestra y verter en un recipiente de tapón de rosca de 500 ml con 225 ml de caldo soya tripticasa estéril adicionado con sulfito de potasio y mezclar bien. Continuar con el procedimiento 1.1.

1.2.11.3 Pimienta de Jamaica (Pimienta inglesa), clavo de especia, canela y orégano No se conoce un método para neutralizar la toxicidad de estas cuatro especias. Diluir por lo tanto, más allá de su poder de toxicidad. Examinar la pimienta, canela y orégano en una proporción 1:100 muestra/caldo, y el clavo a 1:1000 muestra/caldo. Seguir el procedimiento igual que en 1.2.11.1.

1.2.12 Gelatina

Pesar asépticamente 25 g de muestra en un recipiente de boca ancha y tapón de rosca de 500 ml. Adicionar 225 ml de caldo lactosado estéril con 5 ml de solución acuosa de gelatinasa al 5% y mezclar bien. Dejar reposar 60 min y continuar igual que el procedimiento 1.1.

2 Aislamiento de Salmonella

2.1 Cerrar firmemente el tapón de rosca de los matraces con los cultivos de preenriquecimiento y agitar suavemente, transferir respectivamente 1 ml de la mezcla a un tubo que contenga 10 ml de caldo tetrionato y a otro con 10 ml de caldo selenito cistina. Como alternativa, en sustitución del caldo tetrionato puede emplearse el medio Vassiliadis-Rappaport.

2.2 Incubar de 18 a 24 h a 35°C o, para alimentos fuertemente contaminados a 42°C por el mismo periodo. Estriar los productos que fueron directamente enriquecidos en medios selectivos.

2.3 Mezclar el tubo con caldo selenito cistina y estriar en agar xilosa lisina desoxicolato (XLD), agar verde brillante (VB) y una tercera caja con cualquiera de los medios selectivos adicionales (agar entérico Hektoen, agar Sulfito de Bismuto o Agar SS).Efectuar el mismo procedimiento para el caldo tetrionato. Incubar las placas 24 ± 2 h a 35°C.

2.4 Examinar las placas para investigar la presencia de colonias típicas de Salmonella, de acuerdo con las siguientes características:

Agar XLD: colonias rosas o rojas que pueden ser transparentes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.

Agar VB: colonias rojas o rosas que pueden ser transparentes rodeadas por medio enrojecido; las bacterias fermentadoras de la lactosa dan colonias amarillas.

Agar entérico Hektoen: colonias verdes o azulverdes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.

Agar Sulfito de Bismuto: las colonias típicas de Salmonella pueden ser cafés, grises o negras; con o sin brillo metálico. Generalmente el medio circundante (halo) es café, tornándose posteriormente negro. Algunas cepas producen colonias verdes sin la formación del halo oscuro. Si las placas no muestran colonias típicas o no se observa crecimiento, incubar 24 h adicionales.

Agar SS: colonias translúcidas, ocasionalmente opacas. Algunas colonias dan centro negro. Las colonias fermentadoras de la lactosa son rojas.

3 Identificación bioquímica

3.1 Seleccionar al menos dos colonias típicas de cada medio selectivo, que se encuentren bien aisladas.

Tocar levemente el centro de cada colonia e inocular dos tubos, uno con agar triple azúcar hierro (TSI) y otro con agar hierro lisina (LIA), por estría en la superficie inclinada y por punción en el fondo.

Incubar por 24 ± 2 h a 35°C .

Almacenar en refrigeración de 5 a 8°C las placas con medios selectivos por si es necesario retomar más colonias.

3.2 Observar el crecimiento en los tubos y considerar presuntivamente positivas para Salmonella las colonias que den las siguientes reacciones:

3.2.1 Agar TSI, en el fondo del tubo se observa vire del indicador debido a la fermentación de la glucosa; en la superficie del medio se observa un color rojo más intenso que el medio original debido a la no fermentación de la lactosa ni de la sacarosa. En la mayoría de los casos se observa coloración negra a lo largo de la punción debido a la producción de ácido sulfhídrico.

3.2.2 Agar LIA, se observa intensificación del color púrpura en todo el tubo por la descarboxilación de la lisina. Considerar negativos aquellos cultivos que produzcan claramente color amarillo en el fondo del agar. La mayoría de las cepas de Salmonella producen ácido sulfhídrico en este medio con ennegrecimiento a lo largo de la punción.

3.2.3 Retener todos los cultivos que muestren las reacciones características de Salmonella en los medios TSI y LIA para las pruebas adicionales, indicadas en 3.3.

3.3 Los cultivos con TSI que no parecen de Salmonella pero que presentan reacciones en LIA típicos, deben trabajarse como cultivos presuntivos positivos, ya que en estos casos, el medio LIA permitirá detectar *S. arizonae* y cepas atípicas de Salmonella que utilicen lactosa o sacarosa. Descartar solamente los cultivos que muestren reacciones atípicas en ambos medios.

3.4 Continuar el análisis a partir de los tubos de TSI con reacciones típicas. Si el cultivo presenta

reacciones atípicas en este medio, tomar colonias adicionales de las placas de donde se obtuvo el cultivo atípico anterior y sembrar las pruebas bioquímicas nuevamente.

3.5 Continuar la identificación bioquímica y serológica a partir de los cultivos recuperados de TSI. Se recomienda trabajar seis cultivos por cada 25 g de unidad analítica seleccionando colonias procedentes de ambos medios de enriquecimiento.

3.6 Prueba de ureasa

3.6.1 Prueba de ureasa (convencional). Con una asa estéril, tomar crecimiento del cultivo presumiblemente positivo de cada tubo de medio TSI e inocular tubos de caldo urea. Utilizar un control de medio para comparar el vire púrpura de las reacciones positivas con el color del medio original. Incubar 24 ± 2 h a 35°C .

3.6.2 Prueba de ureasa (rápida). Tomar dos asadas de crecimiento del cultivo presumiblemente positivo de cada tubo de medio TSI e inocular tubos de caldo urea (rápida). Incubar 2 h a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ en baño de agua.

Descartar todos los cultivos que den ureasa positiva. Retener los cultivos que den la prueba negativa (sin cambio de color del medio).

4 Identificación serológica

4.1 Ensayo de los antígenos somáticos de Salmonella (Antisuero polivalente O)

4.1.1 Colocar con una asa dos gotas separadas de solución salina estéril sobre un portaobjetos o en dos secciones de una placa para aglutinación. Suspender en cada una de las gotas, una porción del cultivo desarrollado en TSI.

4.1.2 Agregar a una de ellas una gota del antisuero polivalente somático (O) y mezclar con el canto del asa o empleando aplicadores de madera.

4.1.3 Agitar inclinando la lámina hacia atrás y hacia adelante durante aproximadamente un min. Observar bajo buena iluminación sobre un fondo oscuro.

4.1.4 Considerar cualquier grado de aglutinación como positiva.

La prueba positiva resulta cuando se presenta aglutinación en la gota con el cultivo y el antisuero y no aglutinación en la gota que contiene el cultivo y la solución salina.

Si se observa aglutinación en ambas gotas, la prueba no es definitiva y se debe continuar con las pruebas bioquímicas complementarias.

4.2 Cuando la aglutinación es positiva con el suero polivalente O, puede determinarse el subgrupo empleando antisueros para los diferentes subgrupos (los grupos B, C, D y E, suelen ser los más frecuentes).

4.2.1 Si la aglutinación con el antisuero O es negativa, utilizar antisuero Vi y efectuar la prueba. Si hay aglutinación con Vi calentar el cultivo a ebullición y repetir la aglutinación con el antisuero polivalente O.

4.2.2 Si no se cuenta con los sueros grupoespecíficos, solicitar la tipificación de la cepa al Laboratorio de Enterobacterias del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia de la Secretaría de Salud o al Laboratorio Nacional de Salud Pública.

4.3 Si se requiere, practicar el ensayo de los antígenos flagelares de Salmonella (Antisuero polivalente H).

4.3.1 Inocular el crecimiento del tubo de TSI en agar infusión de cerebro corazón e incubar de 4 a 6 h a 35°C hasta que se observe crecimiento (para ensayo en el mismo día), o bien, en caldo soya tripticaseina e incubar por 24 ± 2 h a 35°C (para ensayo al día siguiente). Adicionar 2,5 ml de solución salina formalizada a 5 ml del cultivo en caldo o al cultivo en agar cerebro corazón (BHI).

8.4.3.2 Colocar 0,5 ml del antisuero polivalente flagelar (H) preparado en un tubo para serología (13 x 100 mm aproximadamente). Adicionar 0,5 ml del cultivo formalizado. Preparar un control de solución salina mezclando 0,5 ml de solución salina formalizada con 0,5 ml del antígeno formalizado. Incubar las mezclas en baño de agua a 48-50°C. Observar a intervalos de 15 min por espacio de una h. Una prueba positiva es cuando se observa aglutinación en la mezcla de prueba pero no en el control. Debe interpretarse como negativa una prueba en la que ninguna de las mezclas muestre aglutinación. Cuando ambas mezclas se aglutinan, se considera la prueba inespecífica.

5 Pruebas bioquímicas complementarias

Cuando las pruebas serológicas o bioquímicas iniciales, dan resultados atípicos o no concluyentes, realizar las pruebas que se describen a continuación:

5.1 Inocular los cultivos positivos provenientes de TSI y LIA en: medio SIM, agar citrato de Simmons, caldo manitol y caldo RM-VP. Usar caldo malonato para confirmar la presencia de la especie *S. arizonae*.

5.2 Interpretar los cambios en los medios inoculados conforme lo siguiente:

5.2.1 Agar citrato Simmons

Inocular por estría el tubo.

Incubar 96 ± 2 h a 35 ± 2 °C.

Prueba positiva: crecimiento acompañado de un cambio de color de verde a azul.

Prueba negativa: ausencia de crecimiento y sin cambio de color.

5.2.2 Medio SIM

Inocular por punción.

Incubar 24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Movilidad.

Prueba positiva: crecimiento a lo largo de la punción y en el seno del medio de cultivo.

Prueba negativa: crecimiento a lo largo de la punción exclusivamente.

Producción de ácido sulfhídrico.

Prueba positiva: desarrollo de un color negro a lo largo de la punción que puede extenderse a todo el medio.

Prueba negativa: ausencia de color negro.

Producción de indol

Adicionar al tubo con medio SIM que presente crecimiento, de 0,2 a 0,3 ml de reactivo de Kovac.

Prueba positiva: desarrollo de un anillo de color rojo.

Prueba negativa: sin cambio de color.

5.2.3 Caldo RM-VP

Inocular un tubo con el medio.

Incubar 48 ± 2 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ para la prueba de VP y 96 h para la prueba RM.

5.2.3.1 Prueba de Voges-Proskauer (VP)

Transferir a un tubo un ml del cultivo de 48 h.

Adicionar 0,6 ml de solución de alfa naftol.

Adicionar 0,2 ml de solución de hidróxido de potasio 40%.

Adicionar algunos cristales de creatinina (opcional).

Interpretar los resultados después de incubar 2 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ o 4 h a temperatura ambiente.

Prueba positiva: desarrollo de color rojo ladrillo.

Prueba negativa: sin cambio de color.

Reincubar el resto del medio RM-VP 48 h más a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

5.2.3.2 Prueba de rojo de metilo (RM)

Adicionar al medio de cultivo de 96 h de incubación de dos a tres gotas de solución de rojo de metilo.

Interpretar los resultados inmediatamente.

Prueba positiva: desarrollo de color rojo.

Prueba negativa: desarrollo de color amarillo.

5.2.4 Caldo malonato

Inocular un tubo conteniendo el medio.

Incubar 40 ± 2 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Prueba positiva: desarrollo de color azul.

Prueba negativa: sin cambio de color.

5.2.5 Caldo manitol

Inocular un tubo conteniendo el medio.

Incubar 24 ± 2 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Prueba positiva: desarrollo de color amarillo.

Prueba negativa: sin cambio de color.

5.3 Consultar los resultados obtenidos en el cuadro 2 para la identificación de los géneros de las bacterias investigadas.

Nota: los sistemas bioquímicos comerciales validados pueden ser usados como alternativa para las pruebas bioquímicas convencionales.

Fórmulas de Cálculo para resultados

Interpretación de reacciones bioquímicas y serológicas.

CUADRO 1

Reacciones bioquímicas	Reacciones serológicas	Interpretación
Típica	Antígeno O, Vi o H positivo	Cepas consideradas como Salmonella
Típica	Todas las reacciones negativas	
Típica	No probada	Puede ser Salmonella
Reacciones atípicas	Antígeno O, Vi o H positivo	
Reacciones atípicas	Todas las reacciones	No debe ser considerada

negativas Salmonella

Nota: Ver apéndice informativo A.

9.2 Reacciones bioquímicas y serológicas de Salmonella

CUADRO 2

Prueba o sustrato	Positivo	Negativo	Reacción
Glucosa (TSI)	amarillo	rojo	+
Lisina descarboxilasa (LIA)	púrpura	amarillo	+
H ₂ S (TSI y LIA)	negro	no negro	+
Ureasa	rojo-púrpura	no hay cambio de color	-
Caldo de lisina descarboxilasa	púrpura	amarillo	+
Caldo dulcitol rojo de fenol	amarillo o gas	no hay cambio de color ni gas	+b
Caldo KCN	crecimiento	no hay crecimiento	-
Caldo malonato	azul	no hay cambio de color	-c
Prueba de indol	superficie color Violeta	superficie color amarillo	-
Prueba del antígeno flagelar	aglutinación	no hay aglutinación	+
Prueba del antígeno somático	aglutinación	no hay aglutinación	+
Caldo lactosa rojo fenol	amarillo o gas	no hay cambio de color ni gas	-c
Caldo sacarosa rojo fenol	amarillo o gas	no hay cambio de color ni gas	-
Prueba Voges- Proskauer	de rosa a rojo	no hay cambio de color	-
Prueba rojo de metilo	rojo difuso	amarillo difuso	+

Citrato de Simmons	crecimiento	no hay	v
	color azul	crecimiento, no hay cambio de color	

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

b La mayoría de los cultivos *S. arizonae* son negativos.

c La mayoría de los cultivos *S. arizonae* son positivos.

Interpretación de resultados

Informar: presencia o ausencia de *Salmonella* en _____ g o _____ ml de muestra.

10. Concordancia con normas internacionales

Esta norma no tiene concordancia con normas internacionales.

Bibliografía

NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.

PRACTICA No. 10 DETERMINACIÓN DE VIBRIO CHOLERAEE EN ALIMENTOS

Objetivo

Establecer el método para estimar la cantidad de Vibrio presentes en un alimento.

Generalidades

La intoxicación alimentaria causada por Vibrio está asociada casi exclusivamente con el consumo de alimentos de origen marino contaminados ingeridos crudos o pobremente cocinados .Existe una marcada incidencia estacional, pues la mayoría de los brotes ocurren durante los meses de verano, cuando el Vibrio es más frecuente en los medios acuáticos y atesta al pescado y marisco.

Son bacilos Gram-negativos, anaerobios facultativos, no esporulados, oxidasa-positivos y halófilos, esto es que requieren sal para alcanzar un crecimiento óptimo.

Material y equipo

- Licuadora y vasos de licuadora estériles.
- Frascos de vidrio de boca ancha tipo tarro de 500 ml de capacidad con tapa de rosca.
- Varilla de vidrio de 3 mm de diámetro y 20 cm de largo, con un doblez terminal en ángulo recto de 4 cm.
- Balanza granataria de 2000 g de capacidad y 0,2 g de sensibilidad.
- Balanza analítica de 120 g de capacidad y 5 mg de sensibilidad.
- Incubadoras de 39-40°C.
- Baño de agua de $42 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ y $35-37^{\circ}\text{C}$.
- Cucharas estériles u otros instrumentos apropiados para transferir muestras de alimentos.
- Cajas Petri estériles de 15 x 100 mm de plástico.
- Pipetas estériles de 1 ml con graduación de 0,01 ml, de 5 y 10 ml con graduación de 0,1 ml.
- Asas bacteriológicas de 3 mm de diámetro de nicromel o platino.
- Tubos de cultivo o de ensayo de 16 x 150 mm y 20 x 150 mm.
- Tubos para bioquímicas o ensaye de 10 x 75 mm o 13 x 100 mm.
- Tijeras y pinzas estériles.
- Lámpara (para observar reacciones serológicas).
- Mecheros.
- Papel pH (rango 1-14) con un máximo de graduación de 0,4 unidades de pH por cambio de color.
- Potenciómetro.
- Bolsas de polietileno de 28 x 37 cm con tapa resellable.

-Aparato de filtración y membranas de 0,45 micras.

Reactivos

Agua Peptonada Alcalina (APW)

FORMULA

Peptona 10 g

Cloruro de Sodio 10 g

Agua destilada 1 000 ml

Disolver los ingredientes. Ajustar el pH de tal forma que después de esterilizar éste sea de $8,5 \pm 0,2$.

Esterilizar en autoclave 10 minutos a 121°C .

Agar Tiosulfato, Citrato, Sales Biliares y Sacarosa (TCBS)

FORMULA

Extracto de levadura 5 g

Proteosa peptona 10 g

Sacarosa 20 g

Tiosulfato de sodio.5H₂O 10 g

Citrato de sodio.2H₂O 10 g

Sales biliares 3 g

Bilis de buey 5 g

Cloruro de sodio 10 g

Citrato férrico 1 g

Azul de bromotimol 40 mg

Azul de timol 40 mg

Agar 15 g

Agua destilada 1 000 ml

-Preparar en un matraz por lo menos tres veces más grande que el volumen requerido de medio. -
Adicionar los ingredientes en agua destilada tibia y calentar con agitación constante hasta ebullición e inmediatamente retirar del calor.

-No esterilizar. Enfriar a 50°C y colocar en cajas de Petri.

-Dejar secar las placas de $37-45^{\circ}\text{C}$ antes de usar.

Agar modificado con Celobiosa, Polimixina B y Colistina (mCPC)

SOLUCION 1 FORMULA

Peptona 10 g

Extracto de carne 5 g

Cloruro de sodio 20 g

Solución Stock de colorante

1 000

1 ml

Agar 15 g

Agua destilada 900 ml

-Ajustar el pH a 7,6. Hierva hasta que se disuelva el Agar.

-Esterilizar por autoclave 15 minutos a 121°C. Enfríe de 48-55°C.

SOLUCION STOCK DE COLORANTES 1 000 X:

FORMULA

Azul de Bromotimol 4 g

Rojo de cresol 4 g

Etanol al 95% 100 ml

-Para obtener un color firme del medio usar una solución colorante stock en lugar de estar pesando repetidamente los colores en polvo.

-Disuelva el colorante en etanol hasta obtener una solución al 4% (peso/volumen).

-Agregue 1 ml de esta solución a cada litro de agar mCPC, la cual tendrá al final 40 mg de Azul de Bromotimol y 40 mg de Rojo Cresol por litro.

SOLUCION 2: FORMULA

Celobiosa 10 g

Colistina 400 000 UI

Polimixina B 100 000 UI

Agua destilada 100 ml

-Disuelva la celobiosa por calentamiento en agua destilada.

-Enfríe y agregue los antibióticos.

-Esterilice por filtración, agregue la solución 2 a la solución 1 mezcle y distribuya en cajas Petri.

Agar T1N1 (Agar Triptona y Sal)

FORMULA

Triptona o tripticasa 10 g

Cloruro de sodio 10 g

Agar 20 g

Agua destilada 1 000 ml

-Suspenda los ingredientes y hierva hasta disolución del agar, si lo desea inclinado, distribuya en tubos.

-Esterilice en autoclave 15 minutos a 121°C.

-Deje solidificar los tubos inclinados, para placas enfríe el medio de 45-50°C y distribuya en cajas Petri estériles.

Agar Gelatina (GA)

FORMULA

Peptona 4 g

Extracto de levadura 1 g

Gelatina 15 g

Agar 15 g

Agua destilada 1 000 ml

-Suspenda los ingredientes y hierva hasta disolución de la gelatina y el agar, ajuste el pH a $7,2 \pm 0,2$.

-Esterilice en autoclave 15 minutos a 121°C.

- Enfríe de 45-50°C y distribuya en cajas Petri estériles.

Agar Gelatina con Sal (GS)

-Preparar agar gelatina (GA), pero adicionando 30 g de Cloruro de Sodio por cada litro.

- Suspenda los ingredientes y hierva hasta disolver la gelatina y el agar. Ajuste el pH de $7,2 \pm 0,2$. Esterilice en autoclave 15 minutos a 121°C.

- Enfríe de 45-50°C, coloque en cajas Petri. Si es necesario para inhibir la diseminación de *Vibrio* spp tal como *V. alginolyticus*, use de 25-30 g de agar por litro.

Caldo Glucosa de Hugh-Leifson

FORMULA

Peptona 2 g

Extracto de levadura 0,5 g

Cloruro de Sodio 20 g

Dextrosa 10 g

Púrpura de Bromocresol 0,015 g

Agar 3 g

Agua destilada 1 000 ml

-Suspenda los ingredientes y hierva hasta disolver el agar.

-Ajuste el pH a $7,4 \pm 0,2$. Coloque en tubos y esterilice en autoclave 15 minutos a 121°C .

Medio Base de Descarboxilasa (Arginina, Lisina y Ornitina)

FORMULA BASE

Peptona 5 g

Extracto de levadura 3 g

Dextrosa (D-glucosa) 1 g

Púrpura de

Bromocresol

0.02 g

Agua destilada 1 000 ml

-Para caldo de Arginina, Lisina y Ornitina, adicione 5 g de L-aminoácido a 1 litro de base. Como control, use base sin suplemento (aminoácido).

- Para *Vibrio* spp halofílicos, adicionar 15 g de Cloruro de Sodio por litro. Ajuste el pH de tal manera que después de la esterilización sea de $6,5 \pm 0,2$.

- Distribuya en tubos y esterilice en autoclave 10 minutos a 121°C .

Caldo Triptona y Caldos Triptona Sal T1N0, T1N1, T1N3 y T1N6, T1N8 y T1N10

FORMULA

Triptona o Tripticasa 10 g

Cloruro de Sodio 0, 10, 30, 60, 80, o 100 g

Agua destilada 1 000 ml

- Disuelva los ingredientes en agua destilada, para T1N0 no agregue Cloruro de sodio, para T1N1 use 10 g de Cloruro de sodio (1% w/v concentración de cloruro de sodio); así respectivamente.
- Para T1N3 usar 30 g de NaCl por litro (3% w/v concentración de cloruro de sodio) Distribuya en tubos de tapón de rosca de 16 x 150mm, tape los tubos.
- Esterilice en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Ajuste el pH a $7,2 \pm 0,2$.

Caldo Soya Tripticasa (TSB)

FORMULA

Peptona de Tripticasa (Tryptona) 17 g

Peptona de fitona (Soytona) 3 g

Cloruro de Sodio 5 g

Fosfato dipotásico 2,5 g

Dextrosa 2,5 g

Agua destilada 1 000 ml

- Suspenda los ingredientes en agua destilada y caliente hasta disolución. Distribuya 225 ml en matraces de 500 ml o tubos.
- Esterilice en autoclave durante 15 minutos a 121°C.
- El pH final debe ser de $7,2 \pm 0,2$.

Agar Soya Tripticasa (TSA)

FORMULA

Peptona tripticasa (Tryptona) 15 g

Peptona de fitona (Soytona) 5 g

Cloruro de Sodio 5 g

Agar 15 g

Agua destilada 1 000 ml

- Suspenda los ingredientes en agua destilada y hierva durante un minuto hasta disolución del agar. -
- Para *Vibrio* spp halofílicos, agregar 15 g de Cloruro de Sodio. Distribuya dentro de tubos o matraces.
- Esterilice en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Deje solidificar los tubos inclinados o deje enfriar de 45-50°C y distribuya en cajas Petri. El pH final debe ser de $7,3 \pm 0,2$.

Agar de Hierro Kligler (KIA)

FORMULA

Peptona polipeptona 20 g

Lactosa 20 g

Dextrosa 1 g

Cloruro de Sodio 5 g

Citrato férrico amoniacal 0,5 g

Tiosulfato de sodio 0,5 g

Rojo de fenol 0,025 g

Agar 15,0 g

Agua destilada 1 000 ml

- Suspender los ingredientes y hervir hasta disolución del agar.
- Distribuir en tubos de tapón de rosca.
- Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Dejar solidificar los tubos inclinados. Ajustar el pH de $7,4 \pm 0,2$.

Agar Arginina Glucosa Inclinado (AGS)

FORMULA

Peptona 5 g

Extracto de levadura 3 g

Tristona 10 g

Cloruro de Sodio 20 g

Glucosa 1 g

L-Arginina (hidrocloruro) 5 g

Citrato férrico amónico 0,5 g

Tiosulfato de Sodio 0,3 g

Púrpura de Bromocresol 0,2 g

Agar 13,5 g

Agua destilada 1 000 ml

- Suspender los ingredientes en agua destilada, hervir hasta disolución del agar,
- Distribuir en cantidades de 5 ml a tubos de 13 x 100 mm. Ajustar el pH de 6,8 a 7,0.
- Esterilizar en autoclave de 10 a 12 minutos a 121°C. Deje solidificar el medio inclinado.

Agar Triple Azúcar y Hierro (TSI)

FORMULA

Polipeptona 20 g
Cloruro de Sodio 5 g
Lactosa 10 g
Sacarosa 10 g
Glucosa 1 g
Sulfato ferroso amónico 0,2 g
Tiosulfato de Sodio 0,2 g
Rojo de fenol 0,025 g
Agar 13 g
Agua destilada 1 000 ml

-Disolver los ingredientes en agua destilada. Mezclar bien y calentar a ebullición, agitando ocasionalmente hasta completa disolución.

-Enfriar a 60°C y ajuste el pH de $7,3 \pm 0,1$.

Agar de Hierro y Lisina (LIA)

FORMULA

Peptona o gelisato 5,0 g
Extracto de levadura 3,0 g
Glucosa 1,0 g
L-Lisina 10,0 g
Citrato férrico amónico 0,5 g
Tiosulfato de sodio 0,04 g
Púrpura de bromocresol 0,02 g
Agar 15,0 g
Agua destilada 1 000 g

-Disolver los ingredientes en el agua destilada y mezclar bien; calentar hasta ebullición con agitación frecuente hasta conseguir la disolución completa.

-Esterilizar en autoclave 12 minutos a 121°C. Enfríar de 50-60°C y ajustar el pH de $6,7 \pm 0,1$.

-Distribuir en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm.

-Los tubos se enfrían en posición inclinada, de tal modo que se obtengan columnas de medio de 3 cm y una parte inclinada de 2 cm.

Caldo Rojo de Metilo y Vogues Proskauer(RM-VP)

FORMULA

Peptona 7 g

Glucosa 5 g

Fosfato dipotásico 5 g

Agua destilada 1 000 ml

-Disolver los ingredientes en 800 ml de agua tibia.

- Para *Vibrio* spp halofílicos, agregar 15 g más de Cloruro de Sodio (para una concentración final del 2%). Filtrar, enfriar a 20°C y diluir a 1 litro.

-Distribuya en tubos. Esterilizar en autoclaves durante 12 - 15 minutos a 121°C. Ajustar el pH de 6,9 +/- 0,2.

Medio para prueba de movilidad (Semisólida)

FORMULA

Peptona 10 g

Extracto de carne 3 g

Cloruro de Sodio 5 g

Agar 4 g

Agua destilada 1 000 ml

-Calentar con agitación y hervir de 1 a 2 minutos hasta disolución del agar.

-Para *Vibrio* spp halofílicos agregar 15 g más de Cloruro de Sodio (para una concentración final del 2%).

-Distribuir en tubos con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C. Ajustar el pH de $7,4 \pm 0,2$.

Soluciones y reactivos

Prueba de Rojo de Metilo.

Reactivo. Fórmula

Rojo de metilo 0,1 g

Alcohol etílico 300 ml

Agua destilada 200 ml

Disolver el Rojo de Metilo en el alcohol y diluir con el agua destilada, para llevar a cabo la prueba, añadir 5 gotas de la solución a 5 ml del cultivo problema.

Resultados: Un color rojo demuestra un pH menor a 4,5 y la prueba es Positiva. Un color amarillo se reporta como prueba Negativa.

Prueba de Vogues-Proskauer.

Esta prueba es para comprobar la presencia del Diacetilo.

Fórmula

Alfa Naftol 5 g

Alcohol Etilico absoluto 100 ml

Añadir 0,6 ml de la solución de Alfa Naftol y 0,2 ml de una solución acuosa al 40% de KOH a 1 ml de cultivo.

Resultados: El desarrollo de una coloración roja en 15 minutos constituye una reacción POSITIVA.

Prueba de Oxidasa.

FORMULA

N,N,N,N-Tetrametil-p-Fenilendiamino 0,5 g

Agua destilada 100 ml

-Conservar en frasco oscuro a 5-10°C. El reactivo se conserva durante 14 días.

-Sembrar en un tubo de base de gelosa para sangre. Incubar 18 horas a 35°C. Agregar 0,3 ml de reactivo.

Resultado: La reacción positiva se observa por la producción de un color azul en un minuto.

Reacción de Indol.

REACTIVO DE KOVAC

FORMULA

p-dimetilaminobenzaldehído 5.0 g

Alcohol amílico o alcohol isoamílico 750 ml

Acido clorhídrico concentrado 25 ml

-Disolver el p-dimetilaminobenzaldehído en el alcohol amílico y agregar el ácido clorhídrico lentamente, gota a gota y agitando.

-Debe conservarse en frasco ámbar con tapón esmerilado; el color del reactivo va del amarillo al café claro. Se debe conservar a 4°C.

Sembrar un tubo con 5 ml de caldo triptona. Incubar 48 hrs a 35o C. Agregar de 0.2 a 0.3 ml del reactivo. El desarrollo de un color intenso, constituye una prueba positiva para indol.

Procedimiento

1.- Toma de muestra

La toma de muestra para análisis microbiológico, se deberá hacer en condiciones asépticas y en recipientes estériles.

2.-Preparación de la muestra

Las muestras de moluscos bivalvos deberán analizarse en su composición básica de líquido y carne. Para moluscos bivalvos desconchar de 10 a 12 piezas grandes, incluir el líquido. Verter 50 g en 450 ml de agua peptonada alcalina (APW), licue para homogeneizar durante 2 minutos a alta velocidad. Esta es la dilución 1:10. Colocar 250 g de esta dilución en un segundo recipiente estéril. Preparar dos series de diluciones 1:100 y 1:1000. En este momento deberá tener dos series de tres diluciones. Incubar una serie a 35-37°C y la otra a 42°C.

3.- Resembrar

Después de la incubación, y sin agitar, transferir el inóculo de la película (crecimiento superficial) con un asa de 3-5 mm de diámetro a una placa por lo menos, de cada uno de los medios de cultivo selectivos: Agar con tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa (TCBS) o al agar modificado con celobiosa, polimixina B y colistina (mCPC), la polimixina inhibe al biotipo Clásico de *V. cholerae*. Incubar el agar TCBS durante 18 a 24 horas de 35-37°C y el agar mCPC durante 18 a 24 horas de 39-40°C.

4.- Morfología colonial.

Examinar las placas a fin de determinar si se presentan las características coloniales que a continuación se describen, seleccionar por lo menos 3 colonias sospechosas de cada placa y aplicarlas con estría cruzada para aislar en agar T1N1 o en agar soya tripticasa con sal (al 2% de concentración de NaCl) e incubar durante 12-18 horas a 35-37°C. Es necesario hacer un cultivo en un medio no selectivo a fin de garantizar la pureza de las colonias, antes de las pruebas bioquímicas, se puede inocular a los agares gelatina (GA) y gelatina sal (GS) en el segundo día. Los resultados serán confiables si las placas de aislamiento muestran colonias puras.

a.- Agar TCBS. Las colonias de *V. cholerae* (El Tor y Clásico) son grandes, lisas, amarillas (positivas para la fermentación de la sacarosa) y ligeramente achatadas, con el centro opaco y los bordes translúcidos.

Nota: Las especies de *Vibrio* no producen colonias pequeñas de color crema en agar TCBS. Las colonias de *V. mimicus*, que están estrechamente relacionadas con la especie anterior, son verdes

(sacarosa negativas). La mayoría de las demás especies de *Vibrio* crecen en agar TCBS y producen colonias amarillas y verdes.

b.- Agar mCPC. Las colonias de *V. cholerae* El Tor son púrpuras (negativas para la fermentación de la celobiosa). El *V. vulnificus* produce colonias amarillas achatadas, con el centro opaco y los bordes translúcidos. La mayoría de las demás especies de *Vibrio* no crecen fácilmente en agar mCPC.

5.- Diferenciación.

Diferenciación de los vibrios sospechosos de los microorganismos que no son vibrios.

a.- TSI,KIA y agar inclinado de Arginina y Glucosa (AGS). Inocular las colonias individuales en medios de cultivo TSI (Agar de Triple Azúcar y Hierro), KIA (Agar de Hierro Kliger) y AGS, picar y estriar en el agar inclinado. Incubar los tubos inoculados, con el tapón no muy apretado, durante 18 a 24 horas de 35-37°C. Se recomiendan estos medios porque las reacciones permiten efectuar una diferenciación presuntiva entre la mayoría de las especies de *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Shigella* y otras bacterias.

b.- Caldo triptona al 3% de NaCl (T1N3). Inocular las colonias en los caldos T1N0 y T1N3 e incubar durante 18 a 24 horas de 35-37°C. El *V. cholerae* y el *V. mimicus* crecerán en T1N0 y T1N3. Algunas especies de bacterias que no son vibrios y que presentan reacciones similares a las de *V. cholerae* en medios de TSI y LIA no crecen en T1N3. La mayoría de las especies *Vibrio* spp, incluyen algunos *V. cholerae* No. 01, crecerán en T1N3 únicamente de la familia *Vibrionaceae* crece solamente en T1N3. Una alternativa consiste en usar agar gelatina (GA) y agar gelatina con 3% de NaCl (GS) para determinar la tolerancia de los cultivos puros a la sal. Dividir las placas en ocho sectores, inocular una línea recta en el centro de un sector de las placas, tanto de GA como de GS con cada cultivo puro. Incubar durante 18 a 24 horas de 35 - 37°C. El *V. cholerae* y el *V. mimicus* crecerán. El *Vibrio* spp halofílico crecerá en ambas placas, porque ellos no requieren de sal. Sólo en la placa con GS. Para leer la reacción de la gelatinasa sostener la placa sobre una superficie negra, observará un halo opaco alrededor de la colonia de los microorganismos gelatinasa positivos.

c.- Caldo glucosa de Hugh-Leifson.

Inocular colonias individuales en tubos duplicados con caldo de glucosa de Hugh-Leifson. Recubrir un tubo con una capa de aceite mineral estéril o vapor líquido (50% de petrolato y 50% de parafina) unos dos centímetros de grueso. Incubar ambos tubos durante 18 a 24 horas de 35-37°C. Las especies de *Vibrio* spp utilizan la glucosa tanto para la oxidación como para la fermentación. Las

especies de *Pseudomonas*, que comúnmente se aíslan del pescado y los mariscos con métodos de enriquecimiento que se usan para las especies de *Vibrio*, utilizan la glucosa sólo para la oxidación.

d.- Prueba de oxidasa.

Realizar la prueba de oxidasa con cultivos puros de agar soya tripticasa (2% de NaCl) u otro medio que no contenga carbohidratos fermentables. Un método fácil consiste en colocar un círculo de papel filtro en una caja de Petri y humedecerlo con algunas gotas de reactivo de oxidasa. Con un palito aplicador de madera, un mondadientes o una asa de platino estéril, sacar un poco de cultivo de la placa y tocar el papel humedecido, si hay microorganismos oxidasa positivos, el papel se tornará púrpura oscura o azul en pocos segundos. Las especies patógenas de *Vibrio* son oxidasa positivas (excepto el *V. metschnikovii*).

3.- Identificación y Confirmación de *V. cholerae* 01, *V. cholerae* NO 01 y *V. mimicus*.

a.- Leer los resultados de las pruebas bioquímicas de TSI, KIA, AGS, T1N0 y T1N3 o GA Y GS, y caldo glucosa de Hugh-Leifson.

b.- Hacer una tinción de Gram a un cultivo de 18 a 24 horas en caldo o agar.

Nota: Los cultivos puros que se someterán a las demás pruebas serológicas y bioquímicas para el *V. cholerae* son sacarosa positivos (amarillo) en agar TCBS y sacarosa negativos (verdes) en el caso de *V. mimicus* o son celobiosa negativos (verde-púrpura) en agar mCPC, crecen en caldo T1N0 o en placas con GA; presentan reacciones características en TSI, KIA y AGS. Son gelatina y oxidasa positivos, son bacilos curvos gram negativos y producen ácido a partir de la glucosa, tanto en la oxidación como en la fermentación, en el caldo de cultivo de Hugh-Leifson.

c.- Pruebas bioquímicas.

Las reacciones bioquímicas para identificación de *V. cholerae* y otras especies bacterianas afines figuran en el cuadro anexo. La fórmula para todos los medios bioquímicos deberá contener por lo menos un 2% de NaCl. En vez de medios convencionales se pueden usar tiras AP120E, con 2% de NaCl como diluyente. Para el *V. cholerae* se puede usar solución salina fisiológica (0,85% de NaCl) como diluyente.

d.- Prueba serológica de aglutinación.

Usar antisuero de diagnóstico del grupo 01 y del subgrupo Inaba (factores AC) y Ogawa (Factores AB) para el antígeno del serotipo 01. Usar cultivos de 16 a 24 horas producidos en TSA. Incluir cultivos positivos y negativos, y los controles salinos para cada antisuero usado. Seguir las instrucciones del antisuero. Como es posible que los antígenos de los antisueros estén relacionados

entre sí, hay que realizar pruebas bioquímicas para confirmar que el cultivo puro sea de *V. cholerae* 01 o No. 01.

Nota: Anticuerpos monoclonales están disponibles, pero el anti-B y anti-C reaccionan opuestamente con bacterias de otras especies. Uso de anticuerpos policlonales y/o monoclonales será para el antígeno del complejo 01

1.- Los cultivos que aglutinan con el antisuero del grupo 01, pero no en solución salina fisiológica simple, son de *V. cholerae* del grupo 01 si las reacciones bioquímicas confirman que el cultivo puro es de *V. cholerae*. Los cultivos que se aglutinan con este antisuero para grupos específicos pueden ser clasificados según el subtipo con anticuerpos Inaba y Ogawa.

- Los cultivos que aglutinan con el suero polivalente (grupo 01) y con los antisueros Inaba y Ogawa, tienen los 3 factores (A,B y C) y son del serotipo Hikojima.

- Los cultivos que aglutinan con el antisuero polivalente pero no aglutinan con antisueros Inaba y Ogawa, no se pueden tipificar con estos antisueros.

2.- Los cultivos de *V. cholerae* cuya identidad se haya confirmado con métodos bioquímicos y que no aglutinen con el antisuero del grupo 01 son *V. cholerae* 0:1. El suero para la clasificación de *V. cholerae* No 0:1 según el tipo se puede obtener de R.J. Siebeling.

3.- Los cultivos que se aglutinan en el antisuero del grupo 01 y en solución salina, no se pueden clasificar según el tipo. Sin embargo, si se usa un medio más rico, como en TSA o agar infusión cerebro corazón (BHI), se puede eliminar esta autoaglutinación.

e. Características mínimas para la identificación de *V. cholerae*.

Las características que permiten suponer la presencia de *V. cholerae* como mínimo son las siguientes:

1.- Morfología.

Bacilo o bacilo encorvado, esporogénico y gram negativo.

2.- Aspecto en TSI.

Estría ácido, picadura ácido, gas negativo y H₂S negativo.

3.- Prueba de Hugh-Leifson.

Fermentación de la glucosa y oxidación positiva.

4.- Citocromo-oxidasa positivo.

5.- Prueba de la Dihidrolasa arginina: negativo.

6.- Prueba de la Lisinadescarboxilasa: positivo.

7.- Prueba de VP: Positivo El Tor, negativo Clásico y *V. mimicus*.

8.- Crecimiento a 42°C: positivo.

9.- Prueba de halofilia con NaCl. 0%: positivo, 3%: positivo, 6%: usualmente negativo. Algunas cepas de

V. cholerae NO 01 se desarrollan a 0% de NaCl.

10.- Fermentación de la sacarosa: positivo para *V. cholerae* (negativo para *V. mimicus*).

11.- Prueba de ONPG: positivo.

12.- Fermentación de la arabinosa: negativo.

13.- 0/129 sensitiva: sensible para 10 y 150 µg 0/129

REACCIONES DE ALGUNOS *Vibrio* EN AGAR KIA, TSI Y AGS.

Microorganismo	KIA		TSI		AGS	
	Estría picadura		Estría picadura		Estría picadura	
<i>V. cholerae</i>	K	A	A(K)*	A	K	a
<i>V. mimicus</i>	K	A	K(A)*	A	K	A
<i>V. parahemolyticus</i>	K	A	K	A	K	A
<i>V. alginolyticus</i>	K	A	A	A	K	A
<i>V. vulnificus</i>	K o A	A	K(A)*	A	K	A
<i>V. hydrophyla</i>	K o A	A	K o A	A	K	K
<i>V. shigelloides</i>	K o A	A	K o A	A	N	N

* = Raramente

K = Alcalino

A = Acido

a = Ligeramente ácido

N = Neutro

Ninguna de las especies de *Vibrio* enumeradas produce sulfuro de hidrógeno en medios KIA, TSI o AGS, ni una cantidad perceptible de gas a partir de glucosa en medios KIA, TSI o AGS. Algunas especies de *Aeromonas* pueden producir gas a partir de glucosa en estos medios.

Bibliografía

Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009 : Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba.