



Universidad Autónoma de Chihuahua

Facultad de Zootecnia y Ecología

Código: INF 8.3 FZYE 11	Página 1 de 64
Fecha de Emisión: 2010	Fecha de Revisión: 19/04/2013
	Nº de Revisión: 03
Elaboró:	COORDINADOR DE LABORATORIOS
Aprobó:	SECRETARIA ADMINISTRATIVA

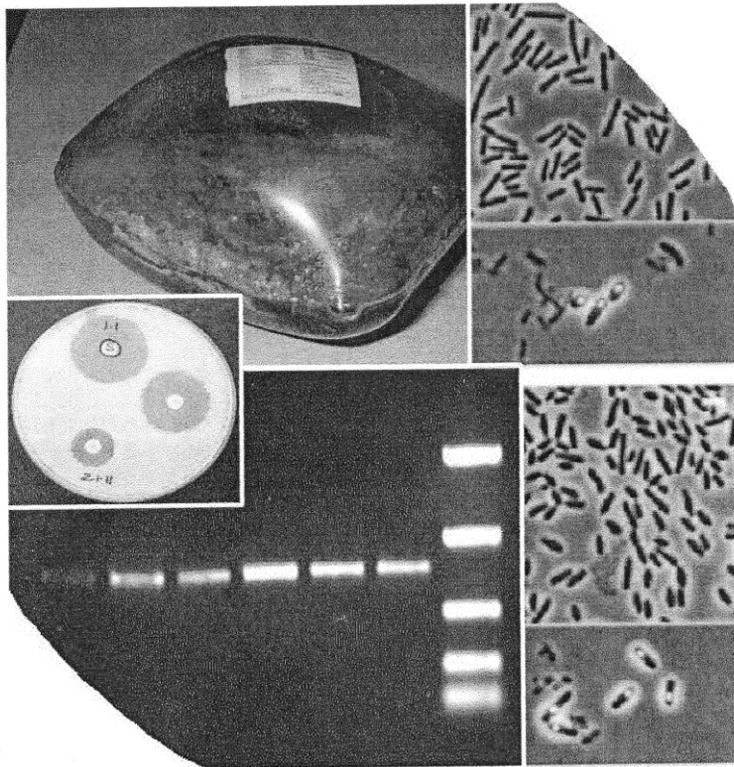
MANUAL DE SEGURIDAD MICROBIOLOGIA



Universidad Autónoma de Chihuahua

Facultad de Zootecnia y Ecología

MANUAL DE TÉCNICAS PARA EL AISLAMIENTO Y ENUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS



2010

C O N T E N I D O

REGLAS DE SEGURIDAD QUE SE DEBEN SEGUIR EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS	1
Reglas para el uso del Laboratorio de Microbiología.....	1
Reglas de Seguridad Personal.....	2
MÉTODOS DE CULTIVO	4
TÉCNICAS GENERALES	4
Series de Diluciones	4
Cuento Total	4
Método de Dilución en Placa	4
Método de Siembra por Extensión en Superficie	4
Método de Miles-Misra	5
Técnica del Número Más Probable	5
ENUMERACIÓN DE PSEUDOMONAS	6
ENUMERACION DE BACILLUS CEREUS	7
ENUMERACION DE LACTOBACILLUS	9
MONITOREO DE LACTOBACILOS Y ESTREPTOCOCOS DURANTE LA PRODUCCIÓN DE YOGURT	10
ENUMERACIÓN DE ESTREPTOCOCOS FECALES	13
ENUMERACIÓN DE ORGANISMOS COLIFORMES TOTALES	16
ENUMERACIÓN DE ORGANISMOS COLIFORMES FECALES	17
Determinación del Número Más Probable (NMP).....	17
Identificación adicional de Coliformes fecales.....	17
DIFERENCIACIÓN DE COLIFORMES	19
CONTEO DIRECTO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> (ANDERSON Y BATRD PARKER, 1975)	20
AISLAMIENTO DE SALMONELLA	26
Serología	32
Método de Aglutinación en Portaobjetos	32
AISLAMIENTO DE SHIGELLA	33

AISLAMIENTO Y ENUMERACIÓN DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	36
Conteo Directo en Placa	36
Enriquecimiento	36
Prueba de la Coagulasa	36
Técnica de la Plaquilla	36
Técnica del Tubo de Ensaye	37
ENUMERACIÓN Y AISLAMIENTO DE <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i>	40
Conteo Directo en Placa	40
Enriquecimiento	40
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i>	42
AISLAMIENTO DE <i>CAMPYLOBACTER JEJUNI/COLI</i>	43
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i> ..	49
ENUMERACIÓN DE <i>AEROMONA HIDRÓFILA</i>	53
ENUMERACIÓN DE HONGOS Y LEVADURAS	55

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE PRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL
DIVISIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

MANUAL DE TÉCNICAS PARA EL AISLAMIENTO Y ENUMERACIÓN DE
MICROORGANISMOS EN ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

M.C. OLGA CANO DE LOS RIOS CARRANZA

REGLAS DE SEGURIDAD QUE SE DEBEN SEGUIR EN EL LABORATORIO DE
MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS.

Con el fin de evitar al máximo intoxicaciones bacterianas y posibles daños causados por el uso indebido de la cristalería, material y reactivos, se deben seguir las siguientes reglas:

Reglas para el uso del Laboratorio de Microbiología.

1. Abrigos, bolsas, etc., deben dejarse afuera del laboratorio de preferencia en un locker.
2. Se debe usar bata de laboratorio durante todo el tiempo de permanencia en el laboratorio de microbiología.
3. Las batas se deben dejar en el laboratorio antes de abandonarlo.
4. No se permite comer, fumar o beber dentro del laboratorio.
5. No llevarse los dedos de las manos a la boca u ojos mientras se trabaja.
6. Toda cortada en la piel debe desinfectarse y cubrirse propiamente con material a prueba de agua.
7. Al final del trabajo diario las mesas se deben limpiar con una solución desinfectante. Ejemplo: Yodoformo.
8. Lavarse las manos antes de abandonar el laboratorio.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE PRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL
DIVISIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

MANUAL DE TÉCNICAS PARA EL AISLAMIENTO Y ENUMERACIÓN DE
MICROORGANISMOS EN ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

M.C. OLGA CANO DE LOS RÍOS CARRANZA

REGLAS DE SEGURIDAD QUE SE DEBEN SEGUIR EN EL LABORATORIO DE
MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS.

Con el fin de evitar al máximo intoxicaciones bacterianas y posibles daños causados por el uso indebido de la cristalería, material y reactivos, se deben seguir las siguientes reglas:

Reglas para el uso del Laboratorio de Microbiología.

1. Abrigos, bolsas, etc., deben dejarse afuera del laboratorio de preferencia en un locker.
2. Se debe usar bata de laboratorio durante todo el tiempo de permanencia en el laboratorio de microbiología.
3. Las batas se deben dejar en el laboratorio antes de abandonarlo.
4. No se permite comer, fumar o beber dentro del laboratorio.
5. No llevarse los dedos de las manos a la boca u ojos mientras se trabaja.
6. Toda cortada en la piel debe desinfectarse y cubrirse propiamente con material a prueba de agua.
7. Al final del trabajo diario las mesas se deben limpiar con una solución desinfectante. Ejemplo: Yodoformo.
8. Lavarse las manos antes de abandonar el laboratorio.

Reglas de Seguridad Personal

1. Todo el material contaminado que haya servido para algún análisis debe ser esterilizado antes de limpiarlo o tirarlo.
2. Todo material utilizado para toma de y preparación de muestras debe ser debidamente limpiado y desinfectado después de usarse.
3. Todas las muestras que no se están usando o ya hayan sido utilizadas, deben cerrarse y almacenarse de inmediato.
4. No pipetear con la boca, hacerlo con una bomba de seguridad.
5. Las pipetas, portaobjetos y cubreobjetos contaminados deben colocarse en un recipiente apropiado, el cual contenga un desinfectante.
6. Cuando un cultivo se cae al suelo no agacharse inmediatamente a tratar de limpiar, sino aplicar un bactericida.
7. Cuando se trabaje con organismos altamente infecciosos deben usarse guantes y lentes de seguridad, terminado el trabajo, lavarse las manos, esterilizar el equipo que fue usado e inclusive las batas antes de ser enviadas a la lavandería.
8. Asas de platino y cualquier material usado para inoculación debe ser esterilizado antes y después de su uso calentándose en la flama del mechero hasta la aparición de un color rojo intenso a lo largo del platino del asa.
9. Los tubos conteniendo cultivos deben ser manejados en gradillas y nunca dejarlos directamente sobre las mesas.
10. Todo tipo de etiqueta debe ser autoadherible para evitar el humedecerla con la boca.
11. Los tapones de algodón que se les colocan a las pipetas son para evitar contaminación del líquido que está siendo pipeteado y no para prevenir infecciones en las personas que las están usando. Por lo anterior nunca se debe pipetear con la boca.
12. Cada 6 meses deben ser probadas las condiciones de esterilidad del autoclave.
13. Deben tomarse cada mes muestras del medio ambiente existente en el laboratorio de microbiología de alimentos.

BIBLIOGRAFIA

Seminario de Microbiología de Alimentos, Costa Rica 1974.

Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology, W.F. Harrigan, and Margaret E. McCance, Academic Press. London New York, Sn. Francisco, 1976.

Microorganisms in Food. Their Significance and Methods of Enumeration. ICMSF. Seven Edition. University of Toronto Press. 1978.

MÉTODOS DE CULTIVO

Para que un organismo pueda cumplir su función (nacer, crecer y reproducirse) requiere de ciertas condiciones ambientales, de determinado tipo de alimento, de agua, etc.

Las bacterias así mismo necesitan ciertos nutrientes, humedad, temperatura e incluso diferente composición atmosférica para desarrollarse y multiplicarse.

Las necesidades de cada familia y género en cuanto a condiciones de vida pueden ser muy diferentes o semejantes.

Para poder identificar y cuantificar bacterias presentes en una superficie, alimento, agua, etc., se usan diferentes técnicas para tomar y procesar la muestra, y para distribuirla en los medios de cultivo que contienen los nutrientes necesarios para favorecer el crecimiento de ciertos microorganismos.

TÉCNICAS GENERALES

1. Series de Diluciones

Pesar 30 gr de muestra a analizar, agregar 270 ml de diluyente estéril (Peptona al 0.1%) y macerar la muestra en un Atomix Blender o en un Stomacher Colworth, dándonos una dilución de 10^{-1} . Utilizando una pipeta estéril se transfiere 1 ml de la dilución 10^{-1} a una botella o tubo conteniendo 9 ml de diluyente estéril, esto nos proporciona una dilución de 10^{-2} . Repitiendo el proceso se preparan diluciones de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} .

2. Conteo Total

Método de Dilución en Placa.

Transferir 1 ml de alícuota de la muestra diluida a cajas de petri en duplicado. Agregar 15 ml de Agar, el cual ha sido licuado a una temperatura de 45°C . Mezclar la muestra y el agar, dejar enfriar hasta que el agar cuaje completamente. Antes de transferir las cajas de petri a la incubadora asegurarse de que están bien secas. Incubar a 30°C por 48 horas en posición invertida.

Método de Siembra por Extensión en Superficie.

Utilizar cajas de petri que contengan 15 ml de agar. Pipetear 1 ml de muestra diluida en la superficie del agar, y extender el inóculo utilizando un bastón de vidrio estéril. Cajas de petri en duplicado deben ser preparadas para cada dilución, luego deben secarse e incubarse en la forma mencionada en el párrafo anterior.

Método de Miles-Misra.

Se marcan 6 espacios en la base de una caja de petri la cual contiene agar debidamente solidificado y seco. Cada uno de los espacios se marcan con el número de dilución apropiado. Empezando con la suspensión más diluida se coloca una gota en el centro del correspondiente espacio utilizando una pipeta Pasteur calibrada. Incubar a 30°C por 48 horas en posición invertida.

3. Técnica del Número Más Probable.

Pipetear 1 ml de dilución 10^{-1} en cada uno de 3 tubos que contienen medio de cultivo. Repetir el mismo procedimiento con las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} . Incubar los tubos a la temperatura apropiada durante 24-48 horas. Después de 24 horas registrar los tubos que muestran reacción positiva, los demás tubos retornarlos a la incubadora por 24 hrs. más. Sumar el total de tubos positivos en cada grupo y obtener el NMP de organismos por gramo de muestra refiriéndose a la siguiente tabla.

No. de tubos positivos			NMP por gr	Límites de Confianza			
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}		99%	95%	95%	99%
0	1	0	3	1	23	1	17
1	0	0	4	1	28	1	21
1	0	1	7	1	35	2	27
1	1	0	7	1	36	2	28
1	2	0	11	2	44	4	35
2	0	0	9	1	50	2	38
2	0	1	14	3	62	5	48
2	1	0	15	3	65	5	50
2	1	1	20	5	77	8	61
2	2	0	21	5	80	8	63
3	0	0	23	4	177	7	129
3	0	1	40	10	230	10	180
3	1	0	40	10	290	20	210
3	1	1	70	20	370	20	280
3	2	0	90	20	520	30	390
3	2	1	150	30	660	50	510
3	2	2	210	50	820	80	640
3	3	0	200	100	1900	100	1400
3	3	1	500	100	3200	200	2400
3	3	2	1100	200	6400	300	4800

Datos calculados por de Man, 1975, The probability of most probable numbers. Eur. J. Appl. Microbiol. 1:67.

ENUMERACIÓN DE PSEUDOMONAS

- a. Preparar muestras de alimento como se describe en la sección de Técnicas Generales.
- b. Preparar cajas de cultivo por duplicado conteniendo medio de Masurousky's, Cetrimide o Agar Pseudomona.
- c. Inocular las cajas con 0.1 ml de diluciones 10^{-1} a 10^{-4} .
- d. Incubar a 27°C por tres días.
- e. Contar las colonias de centro rosa en el medio de Masurousky's y calcular el número de Pseudomonas por gramo de muestra.

Medios de Cultivo.

Medio de Masurousky's.

Nitrato de amonio	5.0 gr/lt
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.0 gr/lt
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.2 gr/lt
Fe (CHN ₄) ₂ (SO ₄) 26H ₂ O	0.1 gr/lt
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	0.8 gr/lt
(anhidro)	0.4 gr/lt
L-Arginina (HCl)	10 gr/lt
Rojo Cresol	0.02gr/lt
Extracto de Levadura	0.25gr/lt
Agar	10 gr/lt
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.015gr/lt

pH 7.2

Mezclar bien los ingredientes en 1 litro de agua hirviente. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min. Después de esterilizado el medio agregar:

Eritromicina	0.005 gr/lt.	5.0mg/ml.
Cloranfenicol purificado	0.0025gr/lt.	2.5mg/ml

ENUMERACION DE *BACILLUS CEREUS*

- a. Preparar muestras de alimento como se describe en la sección de Técnicas Generales.
- b. Pipetear 0.1 ml de cada una de las diluciones decimales a cajas de petri en duplicado, los cuales contienen Agar de Rojo de Fenol Yema Polimixina (PREYP) o Agar Selectivo para *Bacillus cereus* (oxoid). Extender la muestra sobre la superficie del agar usando un bastón de vidrio estéril.
- c. Incubar las cajas en forma aeróbica a 35°C por 24 horas.
- d. Contar el número de colonias rodeadas de una zona de opalescencia, con un fondo color violeta-rojo en el Agar PREYP; o colonias planas irregulares de color azul o verde en el Agar selectivo para *Bacillus cereus*.

Contar las colonias de *Bacillus cereus* por el método de tinción.

- e. En análisis de rutina las cuentas presuntivas son frecuentemente suficientes, particularmente si las reacciones son muy típicas, se llevan a cabo las siguientes pruebas confirmar la presencia de *B. Cereus*:

B hemólisis en Agar de Sangre de Caballo
Bastones Gram positivos móviles, la espora se localiza en el centro en forma oval.

Crecimiento anaeróbico en caldo	
glucosa	+
VP	+
Hidrólisis de Gelatina	+
Hidrólisis de Almidón	+
Hidrólisis de Caseína	+
Lecitinasas	+
Azúcares:	
Ácido de glucosa	+
Arabinosa	+
Xilosa	-
Manitol	-

Medios de Cultivo.

Agar de Rojo de Fenol Yema Polimixina (Mossel et al., 1967).	
Extracto de carne	1 gr/lt
Peptona	10 gr/lt
Manitol	10 gr/lt

NaCl	10 gr/lt
Rojo de Fenol (0.2%)	12.5 ml
Agar	15 gr/lt

pH 7.2+ 0.1

Agregar los ingredientes a 890 ml de agua destilada caliente. Hervir para disolver el agar. Transferir a botellas en volúmenes de 90ml y esterilizar a 121°C por 15 min.

Enfriar a 45°C y agregar 10 ml de suspensión de yema de huevo y 1 ml de solución acuosa 0.1% de sulfato de Polimixina B esterilizada por filtración a cada una de las botellas. Transferir el medio a cajas de petri estériles.

Rojo de Fenol.

Moler 0.1 gr de rojo de fenol, agregar 4 ml de NaOH 0.1N, diluir con 46ml de agua destilada.

Literatura citada:

Mossel, D.A.A., Koopman, M.J. and Jongeriuse, 1967. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *Appl. Microbia.* 16:650.

ENUMERACION DE LACTOBACILLUS

- a. Preparar muestras de alimentos como se describe en la sección de Técnicas Generales.
- b. Preparar cajas de cultivo por duplicado conteniendo medio de Man, Rogosa y Sharpe (MRS).
- c. Pipetear 0.1 ml a cada caja conteniendo el medio, a partir de las diluciones 10^{-1} a 10^{-4} .
- d. Incubar a 30°C en atmósfera microaerófila de 5% de CO_2 durante 5 días.
- e. Contar las colonias blancas y opacas en el medio MRS.
- f. Calcular el presunto número de Lactobacillus por gramo de muestra.

Medios de Cultivo.

Agar de Man, Rogosa y Sharpe.	
Peptona	10 gr/lt
Lab-Lemco	8.0 gr/lt
Extracto de Levadura	4.0 gr/lt
Dextrosa	20 gr/lt
Tween 80	1 ml
Fosfato Dipotásico	2.0 gr/lt
Acetato de Sodio. $3\text{H}_2\text{O}$	5.0 gr/lt
Citrato Triamonio	2.0 gr/lt
Sulfato de magnesio. $7\text{H}_2\text{O}$	0.2 gr/lt
Sulfato de Manganeso. $4\text{H}_2\text{O}$	0.05 gr/lt
Agar No.1	10 gr/lt
pH	6.2 (aprox.)

Disolver los ingredientes en agua hirviente, agregar el agar.
Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min.

MONITOREO DE LACTOBACILOS Y ESTREPTOCOCOS DURANTE LA PRODUCCION DE YOGURT

a). Utilizando una pipeta estéril se transfiere 1 ml de yogurt a una botella o tubo conteniendo 9 ml de diluyente estéril, esto nos proporciona una dilución de 10^{-1} . Repitiendo el proceso se preparan diluciones de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} .

b). Transferir 1 ml de alícuota de la muestra diluida a cajas petri en duplicado. Agregar 15 ml de Agar, el cual ha sido licuado a una temperatura de 45°C . Mezclar la muestra y el agar, dejar enfriar hasta completa coagulación del agar. Antes de transferir las cajas de petri a la incubadora asegurarse de que estén bien secas.

Medios de Cultivo.

Medio Diferencial L-S.

Triptona	10 gr/lt
'Lab-lemco' en polvo	5.0 gr/lt
Peptona de Soya	5.0 gr/lt
Extracto de Levadura	5.0 gr/lt
Dextrosa	20 gr/lt
Cloruro de Sodio	5.0 gr/lt
Clorhidrato de L-cisteína	0.3 gr/lt
Agar	13 gr/lt

pH 6.1

Técnica

Se transfieren muestras del yogurt o del cultivo iniciador al Medio Diferencial L-S fundido y enfriado. Se mezclan bien y se vierten en placas.

Se pueden hacer diluciones en una solución de peptona al 0.1% p/v y se añaden volúmenes iguales al Medio de L-S de doble concentración.

El medio se incuba a 43°C durante 48 horas. Se pueden estudiar los recuentos viables totales y los recuentos diferenciales.

Morfología Macroscópica de las Colonias

Aspecto de las colonias después de 48 horas.

Especies de Lactobacilos: Colonias irregulares, rojas con diámetro de 1-1.5mm rodeadas de una zona blanca y opaca.

Especies de Streptococos: Colonias redondas u ovaladas de color rojo, de diámetro de 0.5mm, rodeadas de una zona pequeña y clara.

Agar de Rogosa.

Triptona	10 gr/lt
Extracto de Levadura	5.0 gr/lt
Dextrosa	20 gr/lt
Tween 80	1.0 ml
Fosfato Monopotásico	6.0 gr/lt
Citrato de Amonio	2.0 gr/lt
Acetato de Sodio	25 gr/lt
Acido Acético Glacial	1.32 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.575 gr/lt
MnSO ₄ .2H ₂ O	0.12 gr/lt
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.034 gr/lt
Agar	20 gr/lt

pH 5.4

Técnica.

Para el aislamiento de lactobacilos, Sharpe (1960) recomienda incubar las placas de Rogosa durante 3 días a 37°C ó durante 5 días a 30°C. Es preferible incubarlos en una atmósfera que contenga 95% de Hidrógeno y 5% de Anhidrido Carbónico, lo cual impide la evaporación, proporciona condiciones microaerofílicas que favorecen a los lactobacilos y el anhídrido carbónico posee un efecto estimulante sobre su crecimiento. Si no se dispone de un recipiente adecuado se vierte una segunda capa de Agar de Rogosa sobre la inicial antes de la incubación.

Agar de MRS.

Peptona Bacteriológica	10 gr/lt
'Lab-lemco' en polvo	8 gr/lt
Extracto de Levadura	4 gr/lt
Dextrosa	20 gr/lt
Tween 80	.1 ml
Fosfato Ácido de Potasio	2 gr/lt
Acetato de Sodio. 3H ₂ O	5 gr/lt
Citrato de tri-amonio	2 gr/lt.
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.3 gr/lt
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.05 gr/lt
Agar	

pH 6.2

Técnica.

Para el aislamiento de lactobacilos: se añaden volúmenes de 1 ml de las muestras diluidas a placas de petri estériles, se vierte Agar de MRS fundido (a 45°C) dentro de la placa y se mezcla bien. Cuando el medio se haya solidificado, se vierte otra capa de Agar MRS no inoculada sobre la superficie para producir una placa con capas.

Las placas se incuban a 37°C durante 3 días ó a 30°C durante 5 días. El medio de MRS es selectivo para los lactobacilos, pero puede producirse un ligero crecimiento de *Leuconostoc* y *Pedococos*. Se seleccionan colonias aisladas del medio de agar y se tiñen para identificar las supuestas colonias de lactobacilos; se transfieren a un caldo MRS y se incuban a temperatura y tiempos similares a los utilizados para el Agar MRS: se examinan microscópicamente y se subcultivan en agar MRS para hacer una confirmación subsiguiente y una identificación de especies.

Agar de M17.

Triptona	5 gr/lt
Peptona de Soya	5 gr/lt
Digerido de Carne	5 gr/lt
Extracto de Levadura	2.5 gr/lt
Acido Ascórbico	0.5 gr/lt
Sulfato de Magnesio	0.25 gr/lt
Glicerofosfato de Sodio	19 gr/lt
Agar	11 gr/lt

pH 6.0+ 0.2

Después de la esterilización se agrega una solución estéril de Lactosa al 10%.

Técnica.

Para la enumeración de *Streptococcus thermophilus* en yogurt se inoculan placas de Agar M17 con la muestra. Se incuban a 37°C por 48 horas. La identificación de colonias ha sido descrita anteriormente.

ENUMERACIÓN DE ESTREPTOCOCOS FECALES

Conteo Directo en Placa

- a. A cajas de petri por duplicado pipetee alíquotas de 1 ml de cada dilución decimal del alimento homogenizado.
- b. Agregue a cada caja aproximadamente 15 ml de Agar sangre con Violeta Cristal azida (Packer's).
- c. Mezcle la muestra y el agar, incube con las cajas petri invertidas a 35°C durante 72 horas (Packer's) o 48 hrs (KF).
- d. Cuente el Número de colonias coloreadas de violeta en el medio Packer's o rojo fuerte (*S. fecalis*) y rosa brillante (*S. faecium*) en medio KF.
- e. Calcule el presunto número de estreptococos fecales por gramo de muestra.

Confirmación de Estreptococos fecales (enterococos)

- a. Transfiera 5-10 colonias con la apariencia característica de estreptococos fecales a tubos que contengan Caldo de Infusión de Cerebro y Corazón. Incube a 35°C durante 18-48 horas.
- b. Prepare frotis, con el procedimiento de tinción de Gram, de cada cultivo y obsérvelos buscando los Gram positivos típicos, cocos ovalados, en pares o cadenas cortas.
- c. Revise en cada cultivo la presencia o ausencia de catalasa mezclando 3 ml de cada cultivo con cerca de 0.5 ml de Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) al 3 %. La ausencia de burbujas (negativo a catalasa) confirma que el cultivo es un estreptococo.
- d. Inocule cada cultivo de nueva cuenta en un tubo conteniendo Caldo de Infusión Cerebro-Corazón e incube a 44°C por aproximadamente 48 hrs. y observe si hay crecimiento en ellas.
- e. Incube cada cultivo en un tubo conteniendo Caldo de Infusión Cerebro-Corazón adicionado con 6.5% de Cloruro de Sodio (NaCl), incube a 35°C durante 72 horas y observe si hay crecimiento.
- f. Un estreptococo con reacción de catalasa negativa que crece a 44°C y en la presencia de 6.5% de NaCl confirma que el cultivo es un enterococo (Estreptococo Fecal).

Medios de Cultivo

Agar Sangre Cristal Violeta Azida Packer's (Packer's, 1943).

Triptosa	15 gr/lt
Extracto de Carne	3 gr/lt
Cloruro de Sodio	5 gr/lt
Agar	30 gr/lt
Sangre desfibrinada de Oveja	50 ml
Cristal Violeta (0.1% p/v soln. acuosa)	2 ml

"A" de sodio 0.4 gr/lt
pH 7.0 aprox.

Disuelva la Triptosa, el Extracto de Carne, el Cloruro de Sodio y el Agar en agua tibia, caliente hasta hervir la solución para disolver el agar. Enfríe a 50-60°C y ajuste el pH. Distribuya en botellas de 100ml y esterilice en autoclave a 15 psi durante 15 minutos. Enfríe 50°C y agregue lo siguiente a cada 100 ml antes de usarse:

- a) 5 ml de Sangre fresca y desfibrinada de oveja.
- b) 0.2 ml de solución de Cristal Violeta (esterilizada a 15 psi (Kg/cm²) durante 20 minutos y almacenada a 1-5°C.
- c) 1.0 ml de solución acuosa al 5% de "Azida" de Sodio esterilizada en filtro.

Mezcle bien los componentes y vierta la mezcla en las cajas de petri.

Agar-KF Estreptococo (Kenner, et al., 1961).

Proteosa-Peptona	10 gr/lt
Extracto de Levadura	10 gr/lt
Cloruro de Sodio	5 gr/lt
Glicerofosfato de sodio	10 gr/lt
Maltosa	20 gr/lt
Lactosa	1 gr/lt
Azida de sodio	0.4 gr/lt
Púrpura de Bromocresol (1% soln stock)	1.5 ml
Agar	20 gr/lt

pH 7.0 aprox.

Disuelva los ingredientes en agua tibia y caliéntela hasta hervir para disolver el agar. Ponga en botellas un volumen conocido y esterilice en autoclave a 15 psi (1.05Kg/cm²) durante 10 minutos. Enfríe a cerca de 60°C y agregue 1 ml de la solución acuosa al 1% de 2,3,5, Cloruro de Trifeniltetrazolium (indicador) esterilizada en filtro por cada 100 ml de medio estéril. Mezcle bien y use la mezcla para preparar cajas de petri.

Caldo de Infusión de Cerebro Corazón

Infusión de Cerebros de Becerros	200 ml
Infusión de Corazón de Vacunos	250 ml
Peptona o Proteosa-Peptona	10 gr/lt
Cloruro de Sodio	5 gr/lt
Fosfato Disódico	2.5 gr/lt
Glucosa	2 gr/lt

pH 7.4

Preparación de Infusiones

Caliente 1 lt de solución acuosa de Hidróxido de Sodio 1/20 N hasta hervir y agregue 100 gr de carne u órgano molido libre de grasa. Mezcle perfectamente y hierva de nueva cuenta, mantenga la solución caliente durante 20 minutos agitando constantemente filtre a través de varias capas de gasa, exprima el líquido y ajuste el volumen a 1000 ml con agua destilada y use el líquido obtenido para preparar el medio inmediatamente.

Preparación del Medio

Disuelva los ingredientes en agua destilada (550ml) y agregue las infusiones de Cerebro de becerro y de carne vacuno (1000ml). Ponga en tubos 5 ml y esterilice en autoclave a 15 psi durante 15 minutos. Para obtener el mejor resultado use el medio el día que es preparado, de otra manera hiérvalo o póngalo bajo vapor durante varios minutos antes de usarlo.

Caldo de Infusión de Cerebro Corazón adicionado de 6.5% de NaCl.

Prepare el medio como el anterior pero agregue 60 gr/lt de Cloruro de Sodio para dar una concentración final de 6.5%.

Reactivos**Púrpura de Bromocresol.**

Macere 0.1 gr de Púrpura de Bromocresol con 0.1N de Hidróxido de sodio (1 ml). Agregue 8.1 ml de agua destilada para obtener una solución al 1%.

BIBLIOGRAFIA

Henner, b.a., Clark, H.F. and Kabler, P.W. 1961. Faecal Streptococci. 1. Cultivation and enumeration of streptococci in surface waters. Appl. Microbiol. 9:15.

Packer, R.A.. 1943. The use of sodium azide. (NaN₃) and Crystal violet in a selective medium for streptococci and Erysipelothrix rhusiopathiae J. Bacterio, 46:343.

ENUMERACION DE ORGANISMOS COLIFORMES TOTALES

Este grupo de microorganismos consiste de una gran variedad de bacterias que se encuentran presentes en materia fecal del hombre y los animales superiores; también pertenecen a este grupo, ciertas bacterias propias del suelo y de los vegetales. Son bacilos Gram negativos, aerobios, no formadores de esporas, fermentan la lactosa con producción de gas cuando se incuban a 32-35°C.

La enumeración de organismos coliformes se puede realizar en medios sólidos selectivos y diferenciales que permiten su crecimiento y diferenciación de otros microorganismos con los que suelen encontrarse asociados en los alimentos, o utilizando tubos de fermentación que contengan caldo lactosado y computando su número mediante las tablas de Número Más Probable (NMP)

El criterio de selección del medio de cultivo apropiado depende de la densidad de gérmenes que se espera encontrar y de la composición y naturaleza del alimento que se va a analizar. Se recomienda la utilización de caldo lactosado cuando se examina alimentos con números bajos de estas bacterias, que a la vez pueden encontrarse dañadas debido al efecto subletal del calor y otros agentes durante la fabricación del producto.

Determinación del Número Más Probable (NMP)

- a. Preparar la muestra como se describe en la sección de técnicas generales. Las mismas diluciones para la determinación de conteo en placa pueden ser utilizadas.
- b. Pipetear 1 ml de la dilución decimal en cada uno de los 3 tubos de Caldo Lauril Sulfato. (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}).
- c. Incubar los tubos a 35°C por 24 y 48 horas.
- d. Después de 24 hrs., registrar los tubos que muestren producción de gas. Los tubos que no presentan reacción positiva retenerlos en la incubadora por 24 hrs. más.
- e. Después de 48 hrs. registrar los tubos que muestren producción de gas.
- f. Para confirmar que los tubos de Caldo Lauril Sulfato son positivos para organismos coliformes, se transfiere con una asa de platino algo de inóculo a tubos separados de Caldo Verde Bilis Brillante al 2%. Se incuban los tubos durante 24 y 48 hrs. a 35°C y se anota cualquier formación de gas. La presencia de gas confirma la presencia de coliformes.
- g. Registrar el número de tubos que fueron confirmados como positivos para organismos coliformes.
- h. Calcular el NMP de organismos coliformes por gramo de muestra.

Conteo Directo en Placa.

- a. Preparar la muestra de alimento como se describe en la sección de técnicas generales.
- b. Transferir 1 ml de cada dilución de la muestra homogenizada a cajas petri.
- c. Agregar a cada caja de petri de 10 a 20 ml de Agar Rojo Bilis Violeta a 45°C.
- d. Mezclar el contenido de las cajas moviéndolas y rotándolas. Permitir que se solidifique en una superficie plana; agregar de 3 a 4 ml de Agar Rojo Bilis Violeta que va a cubrir la superficie de el medio, inhibiendo el crecimiento de colonias en la superficie.
- e. Invertir e incubar las cajas por 24 hrs. a 35°C. Únicamente colonias de color rojo oscuro que midan 1.5mm o más, y en cajas no muy pobladas, son consideradas como bacterias coliformes. Es preferible contar las cajas que contengan no más de 150 colonias. Multiplicar el número de colonias por la dilución para obtener el número de microorganismos coliformes por gramo de muestra.

ENUMERACION DE ORGANISMOS COLIFORMES FECALES**Determinación del Número Más Probable (NMP)**

- a. Seleccionar tubos de Caldo Lauril Sulfato que fueron gas positivo.
- b. Inocular con un asa de platino, tomando inóculo de cada uno de los cultivos positivos y transferir a tubos de Caldo Bilis Verde Brillante (2%) y tubos que contengan Agua de Triptona.
- c. Anotar lecturas tomadas de los tubos de Caldo Bilis Verde Brillante (2%) después de 24 y 48 hrs. de incubación a 44°C.
- d. Después de 24 hrs. de incubación, pipetear asepticamente porciones de 5 ml de cada tubo de Agua Triptona a tubos separados y hacer la prueba de presencia de Indol.
- e. Cultivos que produjeron gas en presencia de Bilis y además Indol a 44°C son considerados presuntivos positivos de organismos Coliformes Fecales.
- f. Determinar el NMP de Coliformes fecales por gramo de muestra.

Identificación adicional de Coliformes fecales: Prueba IMVIC

- a. Con ayuda de una asa de platino tomar una muestra de los tubos de caldo que resultaron gas positivos e inocular por el método de siembra por estrias en cajas de petri conteniendo Agar McConkey. Incubar las cajas en posición invertida por 24 hrs. a 35°C.
- b. Tomar una colonia que sea representativa de cada caja y sembrarla en Agar Nutritivo inclinado y en Caldo Lactosado. Incubar los cultivos por 24 horas a 35°C.

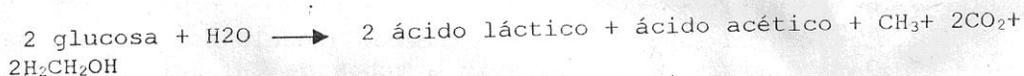
- c. Los tubos gas positivos en Caldo Lactosado deben observarse al microscopio usando el método de tinción de Gram para confirmar la presencia de bastones Gram negativos, no formadores de esporas.
- d. Usar una aguja para inoculación y el cultivo de 24 hrs. en Agar Nutritivo para inocular el medio IMVIC.

Prueba de Indol (Kovacs, 1928)

- a. De los cultivos puros se inoculan tubos conteniendo Agua de Triptona. Se incuban a 35°C por 24 horas.
- b. Agregar de 0.2-0.3 ml del reactivo de indol a cada tubo y agitarlo.
- c. Dejar los tubos en reposo por 10 min. y observar resultados. Un color oscuro en la superficie del acetato de amyl constituye una reacción positiva. El color naranja indica la probable presencia de skatol y debe ser reportada como reacción f.

Prueba de Rojo de Metilo (LJUTOV, 1961)

- a. Inocular con cultivos puros tubos de caldo de Glucosa Buffer. Incubar los tubos a 35°C por 5 días.
- b. Pipetear 5 ml de cada cultivo en recipientes separados y vacíos, agregar 5 gotas de solución de Rojo De Metilo y agitar.
- c. La presencia de un color rojo distintivo se registra como RM positivo, un color amarillo distintivo como RM negativo y una mezcla sombría como interrogativa.



Microorganismos positivos en RM producen ácidos estables manteniendo una alta concentración de iones H_2 hasta que alcanza cierta concentración y después toda actividad cesa.

Microorganismos RM negativos producen ácidos acético, láctico y fórmico pero con menor concentración de iones H_2 , esto se debe a una regresión hacia la neutralidad debido a una posterior degradación de ácidos orgánicos a carbonatos, a bióxido de carbono y posible formación de compuestos de amonio de las proteínas presentes en el medio.

Prueba de Vogues-Proskauer (LJUTOV, 1963; LEVINE., 1916).

- a. Inocular con cultivos puros tubos de Caldo de Glucosa Buffer e incubar a 35°C por 48 hrs.
- b. Transferir 1ml de cada cultivo a tubos de cultivo vacíos y agregar 0.6ml de solución de naftol y 0.2ml de solución de NaOH.
- c. Agitar los tubos y dejarlos reposar de 2 a 4 horas, observar resultados.
- d. Registrar el desarrollo de color rosa a rojo profundo como resultado positivo.



Prueba de Citrato (KOSER, 1923; SIMMONS, 1926)

- a. Inocular tubos de Caldo Koser de Citrato con células de cultivos puros. Usar una aguja recta para evitar el transferir nutriente o medio, lo cual invalida la prueba.
 - b. Incubar los tubos a 35°C por 78-96 horas.
 - c. Anotar crecimiento visible como reacción positiva y no crecimiento como reacción negativa. El crecimiento es usualmente indicado por un cambio en el color del medio, de verde cristalino a azul.
- Para determinar si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como fuente de carbono.

DIFERENCIACION DE COLIFORMES

Todos los siguientes microorganismos son capaces de producir ácido y gas de lactosa en 48 horas a 35°C

	Gas a 44°C	Indol	RM	VP	Citrato
E. coli:					
Tipo I (Típico)	+	+	+	-	-
Tipo II	-	-	+	-	-
Intermedios					
Tipo I	-	-	+	-*	+
Tipo II	-	+	+	-*	+
Enterobacter aerogenes					
Tipo I	-	-	-	+	+
Tipo II	-	+	-	+	+
Enterobacter Cloacae					
Irregular					
Tipo I	-	+	+	-	-
Tipo II	+	-	+	-	-
Tipo IV	+	-	-	+	+
Otros Tipos Irregulares					Reacciones Variables.

Gas en Medio de Bilis-sal lactosa a 44-45.5°C
Reacciones de bilis encontradas ocasionalmente.

CONTEO DIRECTO DE *ESCHERICHIA COLI* (ANDERSON Y BATRD PARKER, 1975)

- a. Preparar las muestras de alimento como se describe en la sección de técnicas generales.
- b. Colocar una membrana de Acetato-Celulosa (85mm de diámetro, 450mm medida del poro oxoid, LTD) en la superficie seca del Agar de Bilis Triptona (TBA) contenido en una caja de petri de 90mm. Fijar la membrana en el agar con la ayuda de un bastón de vidrio.
- c. Pipetear 1 ml de dilución 10^{-1} y 10^{-2} en cada membrana y extender uniformemente sobre la superficie usando un bastón de vidrio estéril.
- d. Secar a temperatura ambiente por 20-30 min.
- e. Incubar en la posición correcta, y apilar las cajas en número no mayor de 3, en una incubadora provista de chaqueta de agua o baño de agua a $44^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.
- f. Después de la incubación tomar las membranas de la superficie del TBA y ponerlas en sus respectivas tapas, las cuales contienen 2.0 ml de reactivo de Indol de Vracko's.
- g. Después de 15 min. remover las membranas de las tapas y secarlas ya sea con lámpara ultravioleta o rayos solares.
- h. Contar el número de colonias rosas y anotarlas como *Escherichia coli* positivas.

NOTA:

Si algún alimento procesado va a ser examinado, ejem: Un proceso mediante el cual las células de *E. coli* han sido sujetas a estrés, se debe incluir un paso extra de resucitación. La membrana debe primeramente ser colocada en Agar Nutritivo o Agar de Soya Tripticasa. Después de la inoculación con las diluciones apropiadas, las cajas deben ser incubadas a 35°C por 4 horas. Después de esto las membranas deben ser transferidas en forma aséptica a cajas de TBA e incubarse como se describe para alimentos no procesados.

Medios de Cultivo

Caldo de Lauril Sulfato

caldo	leite rosado	
✓ Triptosa		20 gr/lt
*Lactosa		5 gr/lt
Cloruro de Sodio		5 gr/lt
Fosfato Dipotásico (K_2HPO_4)		2.75 gr/lt
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)		2.75 gr/lt
Sulfato Lauril Sódico		0.10 gr/lt
pH		6.8 ± 0.2

Disolver los ingredientes en agua destilada y colocar el medio en cantidades de 10 ml en botellas o tubos que contengan tubo de Durham en posición invertida para colección de gas.
Esterilizar a 15 psi por 15 min.

Caldo de Bilis Verde Brillante 2%

Peptona	10 gr/lt
Lactosa	10 gr/lt
Bilis de Buey (purificado)	20 gr/lt
Verde Brillante	0.0133 gr/lt

pH 7.4 aprox.

Disolver los ingredientes en agua destilada y transferir el medio en volúmenes de 10 ml a botellas universales conteniendo tubo de Durham en posición invertida.
Esterilizar a 15 psi por 15 min.

Agar de Bilis Rojo Violeta

Polvo de Extracto de Levadura	3 gr/lt
Peptona	7 gr/lt
Cloruro de Sodio	5 gr/lt
Sales de Bilis No. 3	1.5 gr/lt
Lactosa	10 gr/lt
Rojo Neutro	0.03 gr/lt
Cristal Violeta	0.002 gr/lt
Agar	12 gr/lt

pH 7.4 aprox.

Disolver los ingredientes en agua caliente, hervir hasta disolver el agar. No es necesario esterilizar el medio, usarlo para preparar cajas por el método de vaciado.

Agua de Triptona

Triptona	10 gr/lt
Cloruro de Sodio	5 gr/lt

pH 7.5 aprox.

Disolver los ingredientes en agua destilada y transferir a botellas universales o tubos en volúmenes de 10 ml. Esterilizar a 15 psi durante 15 minutos.

Agar de MacConkey

Peptona	20 gr/lt
Lactosa	10 gr/lt
Sales de Bilis	5 gr/lt

NaCl	5 gr/lt
Rojo Neutro	0.075 gr/lt
Agar	12 gr/lt

pH 7.4 aprox.

Disolver los ingredientes en agua destilada caliente, hervir para disolver el agar. Esterilizar a 15 psi por 15 minutos. Vaciarlo en cajas de petri estériles.

Caldo Buffer de Glucosa (Medio MRVP) *150 ml*

✓ Peptona	5 gr/lt
✓ Glucosa	5 gr/lt
✓ Fosfato monopotásico	5 gr/lt

pH 7.5 aprox.

Disolver los ingredientes en agua destilada y transferir el medio a botellas Bijou en volúmenes de 5 ml y esterilizar a 15 psi por 15 minutos.

Caldo de Citrato Koser *150 ml*

Fosfato sódico amónico	1.5 gr/lt
Fosfato dipotásico	1 gr/lt
Sulfato de Magnesio	0.2 gr/lt
Azul de Bromotimol	0.016 gr/lt
Citrato de Sodio	2.5 gr/lt

pH 6.8 aprox.

Disolver los ingredientes en agua destilada y transferir el medio a botellas Bijou en volúmenes de 5 ml. Esterilizar en autoclave a 15 psi por 15 minutos.

Agar de Bilis Triptona

Triptona	20 gr/lt
Sales de Bilis No.3	1.5 gr/lt
Agar	15 gr/lt

pH 7.2

Disolver los ingredientes en agua caliente y hervir para disolver el agar. Esterilizar a 15 psi por 15 minutos, dejar enfriar hasta una temperatura de 45°C y vaciar en cantidades de 15 ml en cajas de petri previamente esterilizadas.

Agar Nutritivo

Polvo de "Lab. Lemeco"	1 gr/lt
✓ Extracto de Levadura	2 gr/lt
✓ Peptona	5 gr/lt

Cloruro de sodio

5 gr/lt

pH 7.4 aprox.

Disolver los ingredientes en agua caliente y hervir para disolver el agar. Esterilizar a 15 psi por 15 minutos y después transferir a cajas petri esterilizadas.

Agar Soya Tripticasa

Tripticasa

15 gr/lt

Peptona Vegetal

5 gr/lt

Cloruro de Sodio

5 gr/lt

Fosfato Dipotásico

2.5 gr/lt

Glucosa

2.5 gr/lt

Agar

15 gr/lt

pH 7.3

Disolver los ingredientes en agua caliente y después hervir para disolver el agar. Esterilizar a 15 psi por 15 minutos. Enfriar a 45°C y vaciar en cajas de petri estériles.

Caldo MacConkey

Peptona

20 gr/lt

Lactosa

10 gr/lt

Sales Biliares

5 gr/lt

Cloruro de Sodio

5 gr/lt

Rojo Neutro (solución al 1%)

7.5 gr/lt

Púrpura de Bromocresol (Solución al 1%)

1 gr/lt

pH 7.6

Disolver los ingredientes en agua destilada. Transferir a volúmenes necesarios y esterilizar a 15 psi por 15 minutos.

Caldo Nutritivo

Extracto de carne

3 gr/lt

Peptona

5 gr/lt

pH 6.8 aprox.

Disolver los ingredientes en agua destilada y transferir a volúmenes requeridos. Esterilizar a 15 psi por 15 minutos.

Caldo de Enriquecimiento para Enterobacteriaceae (Mosset et al., 1963)

Peptona

10 gr/lt

Glucosa

5 gr/lt

Fosfato Disódico Dihidratado	8 gr/lt
Fosfato Monopotásico	2 gr/lt
Ox-gall	20 gr/lt
Verde Brillante (soln. acuosa 0.5% p/v)	3 gr/lt

pH 7.0

Se analizan el Ox-gall y el Verde Brillante por si estuvieran presentes pequeñas cantidades de células de enterobacterias no debilitadas. Disolver los ingredientes en agua destilada y hervir. Transferir el medio caliente a tubos o botellas estériles. Este medio no se esteriliza pero debe ser enfriado rápidamente hasta alcanzar la temperatura ambiente.

REACTIVOS**Reactivo de Indol (KOVAC'S)**

Paradimetilaminobenzaldehido	5 gr
Alcohol Amílico o Isoamílico	75 ml
Ácido clorhídrico Concentrado	25 ml

Disolver el Benzaldehido en el alcohol amílico y agregar el Ácido Clorhídrico.

Reactivo de Indol (VRACKO'S)

Paradimetilaminobenzaldehido	5 gr
Ácido Clorhídrico 1N	100 ml

Disolver el Benzaldehido en el Ácido Clorhídrico.

Solución de Rojo de Metilo

Rojo de Metilo	0.1 gr
Alcohol Etilico	300 ml
Agua	500 ml

Disolver el Rojo de Metilo en el Etanol y diluir con agua.

Hidróxido de Potasio

Hidróxido de Potasio	40 gr/lt
Agua Destilada	100 ml

Disolver el Hidróxido de Potasio en el agua.

Solución de Naftol al 1%

Alfa Naftol	1 gr
Alcohol grado Absoluto	100 ml

Disolver el Alfa Naftol en el Alcohol absoluto.

BIBLIOGRAFIA

1. Anderson, Judith, M. and A.C. Baird Parker, 1975. A rapid and direct plate method for enumerating *Escherichia coli* biotype 1 in food. *J. appl. Bact.*, 39, 111-117.
2. Koser. S.A. 1923. Utilization of salts of organic acids by the colonaerogenes group. *J. Bacteriol.* 8:493.
3. Koser N. 1928. A simplified method for detecting indole fermentation by bacteria. *Z. Immunitätsforsch.* 56:311 *Chem Abs.* 22:3425.
4. Levine, M. 1916. On the significance of Vogues Proskauer reaction. *J. Bacteriol.* 1:153.
5. Ljutou, V., 1963. Technique of Vogues Proskauer test. *Acta. Pathol. Microbiol. Sacnd.* 58:325.
6. Rayman, M. K. et al., 1979 ICMSE methods studies. XIII. an international comparative study of the MPN procedure and the Anderson Baird Parker direct plating method for the enumeration of *E. coli* biotype 1 in raw meats. *Can. J. Microbiol.* 25:1321.
7. Simmons, J.S. 1926. A culture medium or differentiating organisms of the typhoid-colon-aerogens groups and for isolating certain groups of fungi. *J. Infect. Dis.* 39:209.
8. Mossel. D.A.A., Visser, M., and Cornelissen, A.M.R. 1963. The examination of foods for enterobacteriaceae using a test of the type generally adopted for the detection of Salmonellae. *J. Appl. Bacteriol.* 26:109.

AISLAMIENTO DE SALMONELLA

1. Agregue 25 gr de muestra a un recipiente de boca ancha de 500 ml, el cual contenga 225 ml de Agua de Peptona Buffer (BPW). Si la muestra no se dispersa fácilmente en el BPW entonces mézclese en una batidora y homogenizadora mecánica. Incube durante 18-24 horas a 35°C.

2. Pipete 1 ml del caldo pre-enriquecido en cada uno de dos medios enriquecidos: Caldo de Selenito y Cistina, y Caldo de Tetratiónato Verde Brillante. Incube a 43±0.5°C durante 24 horas.

3. Transfiera con una asa de platino de la superficie de cada uno de los caldos enriquecidos a cada uno de los tres medios de agar selectivos: Agar Verde Brillante, Agar Sulfito de Bismuto y un "Medio Escogido del Laboratorio" ejemplo: XLD, Agar Citrato de Desoxicolato o Agar Salmonella-Shigella). Incube las placas a 35°C y observe si se presentan colonias características de Salmonella después de 24 y 48 horas.

4. Escoja con el asa de inocular estéril, dos o más de cada tipo de colonia sospechosa del Agar Verde Brillante, Sulfito de Bismuto y medio escogido del laboratorio e medios inclinados de Agar Triple de Azúcar y Hierro (TSI) y Agar de Lisina y Hierro (LIA)

5. Incube los medios inclinados a 35°C durante 24 horas. Anote las reacciones descritas a continuación.

AGAR DE LISINA Y HIERRO

CULTIVOS	INCLINADO (pendiente)	FONDO (butt)	H ₂ S
Arizona	Alcalina	Alcalina	+
Salmonella	Alcalina	Alcalina	+
Proteus	Roja	Ácida	-
Providence	Roja	Ácida	-
Citrobacter	Alcalina	Ácida	+
Escherichia	Alcalina	Ácida o Neutral	-
Shigella	Alcalina	Ácida	-
Klebsiella	Alcalina	Alcalina	-

Alcalina = Púrpura

Ácida Amarillo.

AGAR TRIPLE DE AZUCAR Y HIERRO

ORGANISMO	FONDO	PENDIENTE	H ₂ S
Aerobacter aerogenes	AG	A	-
Aerobacter cloaceae	AG	A	-
Escherichia coli	AG	A	-
Proteus vulgaris	AG	A	+
Proteus morganii	A o Ag	NC o ALC	-
Shigella dysenteriae	A	NC o ALC	-
Shigella sonnei	A	NC o ALC	-
Salmonella typhosa	A	NC o ALC	+
Salmonella paratyphi	AG	NC o ALC	-
Salmonella enteritidis	AG	NC o ALC	+
Salmonella typhimurium	AG	NC o ALC	+

AG= Ácida (amarillo) y formación de gas.

A = Ácida (amarillo)

NC= Sin Cambio.

ALC= Alcalina (roja).

+= Sulfuro de Hidrógeno (negro).

--= Sin Producción de Sulfuro de Hidrógeno.

6. Los cultivos que den reacciones positivas a Salmonella pueden ser confirmadas con pruebas serológicas, usando antígenos poly-O y poly-H.

7. Una prueba adicional para la diferenciación entre especies de Salmonella y Shigella de otros miembros de las Enterobacterias es la producción de Ureasa.

8. Inocule Caldo de Urea con un cultivo puro de la bacteria sospechosa. Incube a 35°C y examine después de 6 horas. Cualquier organismo que produzca un color rosado en el caldo (ureasa positiva) no pertenece a los grupos Shigella, Salmonella y puede ser descartado.

Medios de Cultivo

Agua de Peptona Buffer

Peptona	10 gr/l No 30
Cloruro de Sodio	5 gr/lit
Na ₂ HPO ₄	3.5 gr/lit No 13=9gr
KH ₂ PO ₄	1.5 gr/lit No. 49

pH 7.2 aprox.

Disuelva los ingredientes en agua destilada y vierta porciones de 225 ml de la solución en botellas de boca ancha y tapa de rosca de

AGAR TRIPLE DE AZUCAR Y HIERRO

ORGANISMO	FONDO	PENDIENTE	H ₂ S
Aerobacter aerogenes	AG	A	-
Aerobacter cloaceae	AG	A	-
Escherichia coli	AG	A	-
Proteus vulgaris	AG	A	+
Proteus morganii	A o Ag	NC o ALC	-
Shigella disenteriae	A	NC o ALC	-
Shigella sonnei	A	NC o ALC	-
Salmonella typhosa	A	NC o ALC	+
Salmonella paratyphi	AG	NC o ALC	-
Salmonella enteritidis	AG	NC o ALC	+
Salmonella typhimurium	AG	NC o ALC	+

AG= Ácida (amarillo) y formación de gas.

A = Ácida (amarillo) NC= Sin Cambio.

ALC= Alcalina (roja).

+ = Sulfuro de Hidrógeno (negro).

-- Sin Producción de Sulfuro de Hidrógeno.

6. Los cultivos que den reacciones positivas a Salmonella pueden ser confirmadas con pruebas serológicas, usando antígenos poly-O y poly-H.

7. Una prueba adicional para la diferenciación entre especies de Salmonella y Shigella de otros miembros de las Enterobacterias es la producción de Ureasa.

8. Inocule Caldo de Urea con un cultivo puro de la bacteria sospechosa. Incube a 35°C y examine después de 6 horas. Cualquier organismo que produzca un color rosado en el caldo (ureasa positiva) no pertenece a los grupos Shigella, Salmonella y puede ser descartado.

Medios de Cultivo

Agua de Peptona Buffer

Peptona	10 gr/l No 36
Cloruro de Sodio	5 gr/lit
Na ₂ HPO ₄	3.5 gr/lit No 13=9gr
KH ₂ PO ₄	1.5 gr/lit No. 49

pH 7.2 aprox.

Disuelva los ingredientes en agua destilada y vierta porciones de 225 ml de la solución en botellas de boca ancha y tapa de rosca de

500ml. Esterilice por medio de autoclave a 15 psi durante 15 minutos.

Caldo de Selenito y Cistina

Medio Basal.	
Triptona	5 gr/lt
Lactosa	4 gr/lt
Fosfato Dipotásico	10 gr/lt
Selenito Ácido de Sodio	4 gr/lt

Disuelva los ingredientes en 1 litro de agua destilada. Prepare porciones de 10 ml. Caliente en agua hirviendo durante 10 minutos, no ponga en autoclave, enfríe y agregue solución de L-Cistina; 0.1 ml para cada 10 ml de medio. El pH final debe ser aproximadamente 7.0. Use el medio el mismo día de preparado.

Solución de L-Cistina

Disuelva 0.1 gr de L-Cistina en 15 ml de una solución de Hidróxido de Sodio 1N y afore a 100ml de agua destilada estéril. No se ponga en autoclave.

Caldo de Tetracionato Verde Brillante

Medio Basal	
Triptosa o Peptona Proteosa	5 gr/lt
Sales Biliares	1 gr/lt
Carbonato de Calcio	10 gr/lt
Tiosulfato de Sodio	30 gr/lt

Disuelva los ingredientes en agua destilada. Haga porciones de 10 ml y almacénelas a 5-8°C hasta que se necesiten. El día que el medio sea requerido agregue 0.02 ml de solución estéril de Verde Brillante al 0.5%, previamente esterilizada por ebullición durante 10 minutos y 0.2 ml de solución de Yodo. Mezcle y use el medio completo el mismo día.

Solución de Yodo.

Disuelva 5 gr de KI (Yoduro de Potasio) y 6 gr de Yodo (I₂) en 10 ml de agua destilada estéril. Diluya a 20 ml con agua destilada estéril.

Agar Verde Brillante

Extracto de Levadura	3 gr/lt
Peptona-Proteosa o Polipeptona	10 gr/lt
Cloruro de sodio	55 gr/lt
Lactosa	10 gr/lt
Sucrosa	10 gr/lt

Rojo de Fenol (sol.) 0.2%	40 ml
Verde Brillante	2.5 ml
Agar	20 gr/lt
pH	6.9 ± 0.1

Agregue los ingredientes a 960 ml de agua destilada tibia caliente a punto de ebullición para disolver el agar. Vierta a botellas y esterilice mediante autoclave a 15 psi durante 15 minutos. Vierta en cajas de petri estériles.

Agar Sulfito de Bismuto (Medio modificado de Wilson y Blair)

Extracto de Carne	5 gr/lt
Peptona	10 gr/lt
Glucosa	5 gr/lt
Fosfato Disódico	4 gr/lt
Sulfato ferroso	0.3 gr/lt
Indicador sulfito de Bismuto	8 gr/lt
Verde Brillante (sol.) acuosa p/v 0.5 %	5 ml
Agar	20 gr/lt

Disuelva los ingredientes en agua destilada y lleve a punto de ebullición. Se forma un precipitado el cual no se disuelve. Este medio no requiere esterilizarse de nueva cuenta. Solo enfríe a 50-60°C y vierta a cajas de petri estériles. (20ml).

Agar Salmonella-Shigella

Extracto de Carne	5 gr/lt
Peptona o Triptona	5 gr/lt
Lactosa	10 gr/lt
Citrato de sodio	8.5 gr/lt
Tiosulfato de Sodio	8.5 gr/lt
Citrato Férrico	1 gr/lt
Verde Brillante (soln. acuosa p/v 0.1%)	0.33 ml
Rojo Neutro (soln p/v 1%)	2.5 ml
Agar	13.5 gr/lt
pH	7.0

Disuelva los ingredientes en agua tibia, lleve la solución a punto de ebullición para disolver el agar. No esterilice en autoclave. Enfríe y vierta porciones de 20ml en cajas de petri estériles.

Agar Triple de Azúcar y Hierro

Extracto de Carne	3 gr/lt
Extracto de Levadura	3 gr/lt
Peptona	20 gr/lt
Cloruro de Sodio	5 gr/lt

Lactosa	10 gr/lt
Sucrosa	10 gr/lt
Glucosa	1 gr/lt
Citrato Férrico	0.3 gr/lt
Tiosulfato de Sodio	0.3 gr/lt
Rojo de Fenol (soln. 0.2%)	12 ml
Agar	12 gr/lt
pH	7.4

Disuelva los ingredientes en agua tibia, lleve la solución a punto de ebullición para disolver el agar. Ponga porciones de 10 ml en botellas tipo universal y esterilice en autoclave a 15 psi durante 15 minutos. Incline las botellas a enfriar para producir medios inclinados.

Agar de Xilosa y Lisina Desoxicolato (XLD; W.I. Taylor, 1965)

Xilosa	3.75 gr/lt
L-Lisina HCl	5 gr/lt
Lactosa	7.5 gr/lt
Sucrosa	7.5 gr/lt
Cloruro de sodio	5 gr/lt
Extracto de Levadura	3 gr/lt
Rojo de Fenol (soln. 0.2%)	40 ml
Agar	15 gr/lt

Ponga todos los ingredientes en agua tibia (960 ml) y lleve a ebullición la solución para que el agar se disuelva. Esterilice por medio de autoclave a 15 psi durante 15 minutos.

Agregue asépticamente las siguientes soluciones:

a) 20 ml de solución Citrato-Tiosulfato (34 gr de Tiosulfato de sodio y 4 gr de Citrato Férrico de Amonio en 100 ml de agua). Esterilice por filtración.

b) 25 ml de Solución acuosa de Desoxicolato de sodio al 10%, esterilice por filtración o en autoclave a 15 psi durante 15 minutos.

Mezcle bien y vierta porciones de 20 ml aproximadamente a cajas petri.

Agar Citrato Desoxicolato (Hyner, 1942)

Extracto de Carne	5 gr/lt
Proteosa-Peptona	5 gr/lt
Lactosa	10 gr/lt
Citrato de Sodio	8.5 gr/lt
Tiosulfato de Sodio	5.4 gr/lt
Citrato Férrico	1 gr/lt
Desoxicolato de Sodio	5 gr/lt

Rojo Neutral (soln. 1%)	2 ml
Agar	12 gr/lt
pH 7.3	

Disuelva los ingredientes en agua tibia, lleve a punto de ebullición la solución para disolver el agar, cuando esto haya ocurrido enfríe a 50°C y vierta porciones de 20 ml en cajas de petri.

Agar de Lisina y Hierro (P.R. Edwards y Fife.1961).	
Peptona	5 gr/lt
Extracto de Levadura	3 gr/lt
Glucosa	1 gr/lt
L. Lisina	10 gr/lt
Citrato Férrico de Amonio	0.5 gr/lt
Tiosulfato de Sodio	0.04 gr/lt
Púrpura de Bromocresol	0.02 gr/lt
Agar	14.5 gr/lt
pH 6.7	

Disuelva los ingredientes en agua tibia y lleva a punto de ebullición. Separe en porciones de 10ml y esterilice en autoclave a 15 psi durante 15 minutos. Enfríe los tubos en posición inclinada para obtener medios inclinados.

Caldo de Urea

Medio Basal.	
Peptona	1 gr/lt
Glucosa	1 gr/lt
Fosfato Disódico	1.2 gr/lt
Fosfato Monopotásico	0.8 gr/lt
Cloruro de sodio	5 gr/lt
Rojo de Fenol	0.004 gr/lt
pH 6.8	

Disuelva los ingredientes en agua destilada. Ponga porciones de 10 ml en botellas y esterilice en autoclave a 10 psi durante 20 minutos. Deje enfriar y agregue asépticamente 0.5 ml de solución estéril de Urea al 40% a cada botella.

REACTIVOS**Rojo de Fenol**

Disuelva 0.1 gr de Rojo de Fenol en 4.0 ml de solución de Hidróxido de Sodio 0.1N, cuando se haya disuelto agregue 46 ml de agua (solución final 0.2%).

Rojo Neutro

Disuelva 1 gr de Rojo Neutro en un solvente compuesto de 10 ml de agua y 90 ml de Alcohol Etilico.

Serología**Método de Aglutinación en Portaobjetos.**

Colocar 2 gotas de Solución Salina al 0.85% en los extremos de un portaobjetos limpio. De un tubo inclinado conteniendo un cultivo de Salmonella tomar una pequeña cantidad con una asa de platino y hacer una suspensión con cada una de las gotas de soln. salina. Agregar a una de las suspensiones usando asa de platino una cantidad de antisuero "O" y mezclar bien. Mover el portaobjetos por 15-30 seg. Comparar la apariencia de las 2 suspensiones.

En una prueba positiva para Salmonella se va a ver claramente la aglutinación en el término de 1 minuto.

Hacer el mismo procedimiento utilizando polivalente "H".

NOTA: Cuando se utilizan cultivos en medio líquido se omite el uso de solución salina.

BIBLIOGRAFIA

1. Edwards, P.R. y M.A. Fife. 1961. Lysine Iron Agar in the detection of Arizona cultures. Appl. Microbial. 9:478.
2. Hynes, M., 1942. The Isolation of intestinal pathogens by selective media. J. Pathol. Bacteriol. 54:193.
3. Taylor, W.I. 1965. Isolation of Shigella. I. Xilose Lysine Agar; New media for isolation of enteric pathogens Am. J. Clin. Patho. 44:471.

AISLAMIENTO DE SHIGELLA

1. Prepare una muestra como se describe en el aislamiento de Salmonella usando 225 ml de caldo Gram-negativo como medio de cultivo. Incube a 35°C durante 18 horas.
2. Sub-cultive al menos 3 medios, incluyendo XLD y Tergitol7, y cualesquiera de los 2 siguientes: SS o Agar de Desoxicolato Citrato. Incube en cajas petri invertidas a 35°C durante 24 horas y luego examine las colonias:
 - a) XLD-Colonias rojas o rosas de cerca de 1mm de diámetro. Colonias con centros negros no son Shigella, pero pueden ser Proteus, Salmonella o Arizona.
 - b) DCA, SS, o Agar MacConkey- En estos medios las colonias de Shigella aparecen opacas o sin color.
 - c) Agar Tergitol 7, en este medio las colonias de Shigella aparecen color azul.
3. Si el crecimiento típico ocurrió, seleccione tres de las colonias sospechosas de cada medio selectivo y purifique en Agar MacConkey.
4. Inocule en Agar de TSI, incube hasta el día siguiente a 35°C y compare con las reacciones descritas en la sección de aislamiento de Salmonella.
5. Los cultivos sospechosos pueden ser identificados por las siguientes pruebas bioquímicas:

a)

Medio/Prueba	Reacción	% Positivo
Utilización de Acetato	-b	0
Gas Proveniente de Glucosa	-c	2.1
Voges-Proskauer	-	0
Indol	+ & -d	37.8
Rojo de Metilo	+	100
Lisina	-	0
Arginina	+ & -	7.6 (5.6)e
Ornitina	+ & -	20'
Citrato de Christensen	-	0
Lactosa	-f	0.3 (11.4)e
Manitol	+ & -g	80.5
Ureasa	-	0
Motilidad	-	0

b) Algunas variedades de *S. flexneri* 4a utilizan Acetato de Sodio.

- c) Ciertas variedades de *S. flexneri* 6 pueden producir una pequeña cantidad de gas.
 d) El grupo D siempre es negativo pero los grupos A, B y C pueden ser positivos.
 e) (-) reacciones retardadas -3 ϕ m s d;as.
 f) Los cultivos de *S. sonnei* fermentan la lactosa lentamente y descarboxilan a la ornitina.
 g) El grupo A es negativo, pero los grupos B, C y D pueden fermentar este sustrato.

6. La identificación de los cultivos pueden ser confirmadas por medio de la serología.

Medios de Cultivo.

Caldo Gramm Negativo

Triptosa	20 gr/lt
Glucosa	1 gr/lt
Manitol	2 gr/tl
Citrato de Sodio	5 gr/lt
Desoxicolato de Sodio	0.5 gr/lt
Fosfato Dibásico de Potasio	4 gr/lt
Fosfato Monobásico de Potasio	1.5 gr/lt
Cloruro de Sodio	5 gr/lt

pH 7.0

Disuelva los ingredientes en 1 litro de agua destilada, separe en porciones de 225 ml y esterilice en autoclave a 15 psi durante 15 minutos.

XLD, DCA y SS : descritos en la sección "Aislamiento de Salmonella".

Agar Tergitol 7

Peptona	5 gr/lt
Extracto de Levadura	3 gr/lt
Lactosa	10 gr/lt
Tergitol 7	0.1 ml
Azul de Bromotimol (soln. al 0.2%)	12.5 ml
Agar	15 ml

pH 6.9

Disuelva todos los ingredientes en 988 ml de agua destilada tibia, caliente hasta ebullición para disolver el agar, ponga en depósitos y esterilice en autoclave a 15 psi durante 15 minutos; vierta en cajas de petri cuando el medio se haya enfriado a 50°C.

Reactivos.

Azul de Bromotimol

Muela 0.1 gr de azul de bromotimol con 2.5 ml de hidróxido de sodio 1N, agregue 47.5 ml de agua destilada para obtener una solución al 0.2%.

AISALMIENTO Y ENUMERACION DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***Conteo Directo en Placa**

- a. Prepare la muestra de alimentos como se describe en la sección de técnicas generales.
- b. Prepare cajas petri de Agar de Baird Parker y déjelas solidificar en una superficie nivelada.
- c. pipete, 0.1 ml de cada dilución en 2 cajas con agar, distribuya la dilución sobre la superficie del agar por medio de un palillo estéril de vidrio.
- d. Incube las cajas a 35°C. Después de 30 horas de incubación cuente el número de colonias que sean negras y brillantes con márgenes blancos muy angostos, es altamente probable que estas colonias sean de *Staphylococcus aureus*.
- e. Marque la posición de estas colonias e incube otra vez durante 18 horas.
- f. Al final del segundo período de incubación cuente todas las colonias que sean negro-brillante con o sin los márgenes angostos blancos y sin zonas claras rodeándolas.
- g. escoja un mínimo de 5 colonias de cada caja y realice la prueba de producción de coagulasa.
- h. Obtenga el total del número de colonias que produjeron zonas claras después de 30 horas y saque la proporción de las que sean positivas a coagulasa después de la segunda incubación: calcule el número de *S. aureus* por gramo de muestra.

Enriquecimiento.

- a. Ponga 1 ml de la muestra (o 10 ml de soln. 10^{-1}) en 10 ml de Caldo de Carne con sal al 10%. Incube a 35°C durante 24 horas
- b. Sub-cultive en una placa con medio de Baird Parker e incube a 35°C durante 30 y 48 horas.
- c. Observe para localizar colonias con la apariencia característica de *S. aureus* como se describió en la sección anterior.
- d. Reporte *S. aureus* como presente o ausente en 1 gr de muestra.

Prueba de la Coagulasa.**Técnica de la Plaquilla.**

- a. Reinocule colonias sospechosas en Agar Nutritivo e incube hasta el día siguiente a 35°C.
- b. Use tinción de Gram para confirmar la presencia de cocos Gram positivos en pares (diplococos).
- c. Ponga una gota de agua destilada estéril en una plaquilla para microscopio.
- d. Emulsifique la colonia que se desea probar.

Técnica del Tubo de Ensaye.

- a. Diluya el plasma reconstituido de conejo 1 a 6 con una solución salina estéril al 0.9%
- b. Agregue 0.5 ml a un tubo de 7.5 x 1cm., que se encuentra en un baño de agua a 37°C
- c. Agregue 5 gotas del cultivo a probar contenido en Caldo de Infusión de Cerebro-Corazón durante 6-18 horas.
- d. Incube y observe para detectar coagulación a 1,3 y 6 horas, es necesario inspeccionar perfectamente los tubos, ya que si se forma una coagulo este puede ser destruido por lisis y la prueba nos da una reacción negativa que es falsa.
- e. Una variedad de Staphilococcus coagulasa positiva deberá ser incluida en cada grupo de pruebas como control positivo.

Medios de Cultivo**Medio de Baird Parker. (Baird-Parker, 1962 a,b)**

Triptona	10 gr/lt = 1.5g
Extracto de Carne	5 gr/lt = 0.75
Extracto de Levadura	1 gr/lt = 0.15
Hexohidrato de Cloruro de Litio	5 gr/lt = 0.75
Agar	20 gr/lt = 3
Sulfametazina de Sodio (opcional)	0.055 gr/lt
pH	6.8

10g - 1000ml
x - 150ml

Agregue los ingredientes al agua destilada y caliente a ebullición para disolver el agar. Haga porciones de 90ml y esterilice a 15 psi durante 15 minutos.

Si la muestra de alimento contiene gran cantidad de Proteus, agregue sulfametazina como inhibidor a cada litro del medio basal antes del proceso de esterilización (Smith, B.A. y Baird-Parker, 1964). Para preparar la solución de sulfametazina de sodio, disuelva 0.5 gr de sulfametazina de sodio pura en 25 ml de hidróxido de sodio 0.1N y afofe a 250ml con agua destilada: 27.5 ml de esta solución contiene 0.055gr de sulfametazina.

Para Preparar el Medio Completo.

Funda el agar, enfríe a 45°C y agregue lo siguiente a cada 90 ml de base de agar de Baird Parker:

- I. 6.3 ml de solución al 20% de Glicina en base p/v esterilizada por filtración.
- II. 1 ml de solución de Telurito de potasio al 1% en base p/v esterilizada por filtración.
- III. 5 ml de soln. de Piruvato de Sodio al 20% en base p/v esterilizada por filtración.

IV. 5 ml de emulsión de Yema de Huevo (2 yemas de huevo en 5 ml de solución salina 20 ml).

Mezcle bien el medio y vierta inmediatamente en porciones de 15 ml a cajas de petri.

Las cajas con agar de Baird Parker deben ser usadas preferentemente el mismo día que se prepara el medio y nunca si transcurren más de 48 horas de almacenamiento desde su preparación.

Agar Nutritivo

Extracto de Carne	3 gr/lt
Peptona	5 gr/lt
Agar	15 gr/lt

pH 6.8-7.0

Agregue los ingredientes a 1 litro de agua destilada tibia; caliente a punto de ebullición para disolver el agar. Vierta porciones a botellas con cierre de rosca y esterilice en autoclave a 15 psi por 15 minutos. Enfríe a 45-50°C y vierta a cajas de petri.

Caldo de Carne y Sal

Peptona	10 gr/lt
Lab-Lemco	10 gr/lt
Tejido Natural de Corazón Vacuno.	30 gr/lt
Cloruro de sodio	100 gr/lt

pH 7.6

Disuelva los ingredientes en agua destilada y vierta en botellas tipo universal (10ml), esterilice a 15 psi durante 15 minutos.

Caldo de Infusión de Cerebro Corazón

Infusión de Cerebro de Becerro	200 ml
Infusión de Corazón Vacuno	250 ml
Peptona	10 gr/lt
Cloruro de Sodio	5 gr/lt
Fosfato Dibásico de Sodio	2.5 gr/lt
Glucosa	2 gr/lt

pH 5.3

Agregue las infusiones de cerebro de becerro y corazón vacuno a 550ml de agua destilada y agregue los otros ingredientes. Después de disolver vierta volúmenes de 10 ml en botellas de cierre de rosca y esterilice a 15 psi durante 15 minutos.

TABLA 31-2. DIFERENCIACION DE ESTAFILOCOCOS PATOGENOS Y NO PATOGENOS

Características	Cepas patógenas	Cepas no patógenas
Habitat	Piel, vías respiratorias altas, secreciones purulentas	Tierra y agua, materiales orgánicos en descomposición, piel
Producción de pigmento	Amarillo oro o ninguno	Ninguno, amarillo limón, amarillo ladrillo, o rojo
Digestión de gelatina ...	+	-
Digestión de proteínas séricas	+	-
Fermentación de lactosa	+	-
Fermentación de manitol	+	-
Prueba de coagulasa ...	+	-
Hemólisis de medios con sangre	+	-
Producción de enterotoxina	+	-
Nombres de las especies comunes	<i>Staphylococcus pyogenes</i> variedad <i>aureus</i> <i>S. pyogenes</i> variedad <i>albus</i>	<i>Staphylococcus citreus</i> <i>S. epidermidis</i>

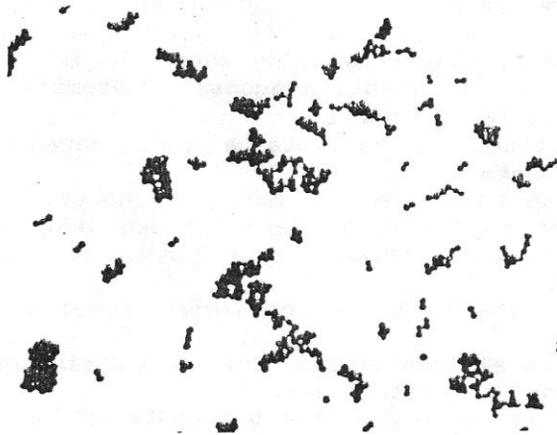
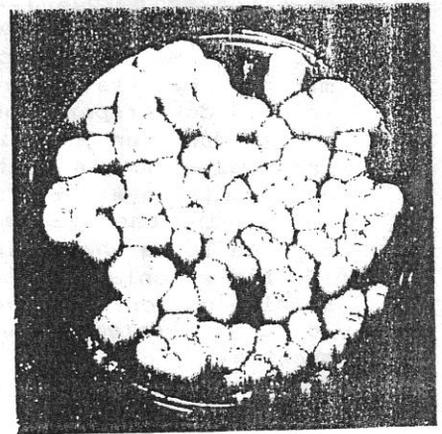


FIG. 28-5 *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ($\times 1,100$). Células de 0.8 a 1.0μ de diámetro, en parejas, cadenas cortas o grupos irregulares. (Según U. S. Naval Biological Laboratory.)

FIG. 28-6 COLONIAS DE *STAPHYLOCOCCUS COAGULASA-POSITIVO*. Crecimiento en medio de yema de huevo y rodeadas de zonas opacas. (Autorización de Lloyd G. Heriman.)



ENUMERACION Y AISLAMIENTO DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

Conteo Directo en Placa

- a. Preparar muestra de alimento como se describe en la sección de Técnicas Generales.
- b. Pipetear 0.1 ml de cada dilución decimal a cajas de petri en duplicado las cuales contienen Agar de Lactosa Yema y Leche (LEYMA). Extender la muestra sobre la superficie del Agar usando un bastón de vidrio estéril.
- c. Incubar las cajas en forma anaeróbica a 35°C por 24 horas.
- d. Contar el número de colonias rodeadas de opalescencia, con un fondo rosa-rojo (debido a la fermentación de lactosa). Calcular el número de colonias de *Cl. perfringens* formando unidades por gramo de muestra.
- e. Para confirmación, se cubre la mitad de una caja de petri que contiene LEYMA con antitoxinas de *Cl. perfringens* y *Cl. oedematiens*. Se toma una de las colonias sospechosas y se hace una estria en el agar empezando por el lado donde no hay antitoxina. Se incuban las cajas en forma anaeróbica a 35°C por 24 horas. Si aparece opalescencia en la parte de la caja donde no hay antitoxina, y sin embargo no aparece en la otra parte, se confirma la presencia de *Cl. perfringens*.

Enriquecimiento.

- a. Agregar 10 gr de la muestra molida a 2 volúmenes de 100 ml de medio de Carne Cocida el cual ha sido hervido y enfriado recientemente (Robertson, M. 1916).

NOTA: Para la selección de *Cl. perfringens* de entre una mezcla de cultivos se agrega 1.2 ml de una solución acuosa de Neomicina al 1% a cada 100 ml de medio de carne cocida.

- b. Una de las preparaciones se calienta a 65°C durante 15 minutos. La otra no se calienta.
- c. Las dos preparaciones se incuban a 35°C por 18-24 horas.
- d. Se hace un sub-cultivo en las cajas de petri por duplicado, las cuales pueden contener ya sea LEYMA o Agar Sangre de caballo con Neomicina al 1%.
- e. Se incuban las cajas a 35°C, un set en forma aeróbica y el otro en forma anaeróbica.
- f. Las colonias sospechosas se identifican como se describe en la sección de conteo directo de *Cl. perfringens*.
- g. *Cl. perfringens* se reporta como presente o ausente en 10 gr de muestra.

Medios de Cultivo**Agar de Lactosa, Yema y Leche (Willos and Hobbs, 1962)**

Agar Infusión de Cerebro Corazón	800 ml/lt
Lactosa	9.6 gr/lt
Rojo Neutro (solución. 1%)	3.25 ml/lt

Disolver los ingredientes en agua destilada y hervir para disolver el agar. Transferirlo a botellas con tapon de rosca en volúmenes de 80 ml. Esterilizar en autoclave a 15 psi por 20 minutos. Enfriar a 45-50°C.

- i) 3 ml de emulsión de yema de huevo recién preparada (mezclar la yema con 5-10 ml de solución salina 0.85 %).
- ii) 12 ml de leche descremada reconstituida estéril. Hervir durante 5 minutos.

Medio de Carne Cocida de Robertson (sint,tico).

Peptona	10 gr/lt
Polvo de Lab-Lemco	10 gr/lt
Proteína de Soya Texturizada	30 gr/lt
Cloruro de sodio	5 gr/lt

pH 7.0

Disolver los ingredientes en agua destilada, transferir en volúmenes de 10 ó 100 ml, esterilizar en autoclave a 15 psi por 15 minutos.

Agar de Sangre de Caballo y Sulfato de Neomicina al 1%.

Agar Base de Sangre.	
Polvo Lab-Lamco	10 gr/lt
Peptona	10 gr/lt
Cloruro de Sodio	5 gr/lt
Agar	15 gr/lt

pH 7.3

Disolver los ingredientes en agua destilada caliente y hervir para disolver el agar. Esterilizar a 15 psi por 15 minutos. Enfriar a 50°C y agregar 7-10% de sangre de caballo defibrinada. Vaciar en cajas de petri. Cuando el agar ya se haya coagulado poner 3 gotas de Sulfato de Neomicina al 1% a cada caja y extender bien sobre la superficie del agar.

Reactivos.**Rojo Neutro 1%.**

Disolver 1 gr de Rojo Neutro en 90 ml de Alcohol. Agregar 10 ml de agua destilada.

BIBLIOGRAFIA.

Willos, A.T., 1962.. Some diagnostic reactions of clostridia. Lab. Pract. 11:526.

Willos, A.T., 1972.. Anaerobic Infections. Public Health Laboratory Service Monograph Series No. 3., 172.

 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CLOSTRIDIUM BOTULINUM

Clostridium botulinum produce una de las más tóxicas sustancias, conocidas y es responsable de la más peligrosa forma de envenenamiento por alimentos. Crece en el mismo medio descrito para la enumeración y aislamiento de *Cl. perfringens*. Las colonias sospechosas de *Cl. botulinum* producen opalescencia y capa perlada en agar LEYMA y no fermentan la lactosa. Ver hoja de identificación en sección anterior. El único método de diferenciación entre *Cl. botulinum* y *Cl. sporogenes* es inyectando el sobrenadante de caldo de carne cocida a ratones. Si el ratón muere, entonces el cultivo es confirmado como *Cl. botulinum*; si el ratón sigue viviendo el cultivo es probablemente *Cl. sporogenes*.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI/COLI*

1. Agregar 25 gr de muestra a un recipiente de boca ancha de 500 ml, el cual, contenga 225 ml de Caldo Nutritivo con 5% de Sangre de Caballo. Si la muestra no se dispersa fácilmente en el caldo de enriquecimiento mezclarla en una batidora u homogenizadora mecánica por 2 minutos. Incubar de 2 a 4 horas a 37°C y después durante 24-48 horas a 42°C.

2. Transferir con un asa de platino de la superficie del caldo enriquecido a la superficie de Agar para *Campylobacter* sin Sangre (Lab M) y al Agar de Butler (Oxoid). Incubar las placas a 37°C por 24-48 horas en un 5% de O₂, 10% CO₂ y 85% de N₂ (jara anaeróbica) y observar si se presentan colonias características de *Campylobacter* después de 24 o 48 horas.

Pruebas Confirmativas.

Tinción de Gramm	Bacilos Gramm Negativos
Catalasa	Positiva
Crecimiento a 42°C	Positivo
Crecimiento a 33°C	Negativo
Crecimiento a 25°C	Negativo
Hidrólisis del Hipurito	Positivo
Producción de DNase	Positivo

Medios de Cultivo.**Caldo de Enriquecimiento *Campylobacter*.**

Peptona de Carne	10 gr/lit
Hidrolizado de Leche y Huevo	5 gr/lit
Extracto de Levadura en Polvo	5 gr/lit
Cloruro de Sodio	5 gr/lit
Hemina	10 gr/lit
Piruvato de Sodio	0.5 gr/lit
Ácido Cetoqlutámico	1 gr/lit
Metabisulfito de Sodio	0.5 gr/lit
Carbonato de Sodio	0.6 gr/lit

pH 7.4 ± 0.2

Suplemento:

Cefoperazona	20 mg/lit
Vancomycin	20 mg/lit
Trimethoprim	20 mg/lit
Cicloheximida	50 mg/lit

Disolver el polvo en agua desionizada y mezclar bien. Colocar 250 ml en botellas con boca ancha de 500ml. Esterilizar a 121°C por 15

minutos. Enfriar a 50°C y agregar el suplemento y la sangre de caballo lisada.

Medio para Campylobacter sin Sangre.

Peptona	25 gr/lt
Carbón Bacteriológico	4 gr/lt
Cloruro de Sodio	3 gr/lt
Desoxicolato de Sodio	1 gr/lt
Sulfato de Hierro	0.25 gr/lt
Piruvato de Sodio	0.25 gr/lt
Agar	12 gr/lt

pH 7.4 +- 0.2

Suplemento:

Cerfoperazona	32 mg/lt
Amfoteracina	10 mg/lt

Disolver los ingredientes en agua desionizada. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar a 47°C y agregar el suplemento. Vaciar a cajas de petri estériles.

Medio Selectivo para Campylobacter-Butzler.

Se preparan 500 ml de Agar Columbia, Base de Agar Sangre No. 2 ó Medio Base para Brucella. Esterilizar a 121°C por 15 minutos y enfriar a 50°C. Agregar Sangre desfibrinada de caballo (5-7%) y un vial del suplemento. Vaciar a cajas de petri estériles.

Suplemento:	por Vial 500 ml
Bacitracina	12,500 unidades
Cicloheximida	25 mg
Sulfato de Colistina	5,000 unidades
Cefazolina Sódica	7.5 mg
Novobiocina	2.5 mg

Para rehidratar el vial se añaden en forma aséptica 3 ml de una solución al 50% de etanol en agua y se gira el vial a través de un eje imaginario en perpendicular hasta disolver.

Medio Selectivo para Campylobacter (Blazer-Wang).

Se preparan 500 ml de Agar Columbia, Base de Agar Sangre No. 2 ó Medio Base para Brucella. Esterilizar a 121°C por 15 minutos y enfriar a 50°C. Agregar sangre desfibrinada de caballo (5-7%) y un vial del suplemento. Mezclar suavemente y distribuir en cajas de petri estériles.

Suplemento:

Vancomicina	5 mg
Polimixina B	1,250 IU
Trimetoprim	2.5 mg
Anfoterizina B	1 mg
Cefhalothina	7.5 mg

Para rehidratar el vial se añaden en forma aseptica 2 ml de agua destilada estéril.

Caldo Nutritivo.

Lab-Lemco en Polvo	1 gr/lt
Extracto de Levadura en Polvo	2 gr/lt
Peptona	5 gr/lt
Cloruro de Sodio	5 gr/lt

pH 7.4

Disolver los ingredientes en agua destilada. Mezclar bien y distribuir en recipientes en cantidades de 10 ml. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Agar Nutritivo.

Lab-Lemco en polvo	1 gr/lt
Extracto de Levadura	2 gr/lt
Peptona	5 gr/lt
Cloruro de Sodio	5 gr/lt
Agar	15 gr/lt

pH 7.4 (aprox).

Disolver los ingredientes en agua destilada y hervir hasta disolver el medio por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Distribuir en cajas de petri estériles.

Agar DNAsa.

Triptosa	20 gr/lt
Acido Desoxirribonucleico	2 gr/lt
Cloruro de Sodio	5 gr/lt
Agar	12 gr/lt

Disolver los ingredientes en agua destilada y hervir hasta disolver el medio por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Técnica.

Se inoculan las placas sembrando en botón el microorganismo sobre la superficie del agar en forma que produzca un crecimiento denso después de 18 horas de incubación. Se inundan las placas con HCl 1N y se observa si se forman zonas de aclaramiento alrededor de los botones (DNAsa positivo).

Caldo de Hipurito de Sodio.

(Caldo de Cerebro y Corazón).

Infusión de Cerebro Ternera en forma sólida	12.5 gr/lt
Infusión de Corazón de vaca en forma sólida	5 gr/lt
Peptona-Proteosa	10 gr/lt
Dextrosa	2 gr/lt
Cloruro de Sodio	5 gr/lt
Fosfato Disódico	2.5 gr/lt

pH 7.4

Se agrega hipurito de sodio 1%.

Reactivo de Cloruro Ácido Férrico.

Cloruro Férrico acuoso ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	13 gr
HCl concentrado	2.5 ml
Agua Destilada	100 ml

Control de Calidad del Reactivo.

1. Necesario antes de colocar el reactivo en los tubos de prueba con microorganismos puros.

2. Control Negativo.

- Se ponen 0.8 ml de Caldo con Cultivo.
- Se agregan 0.2 ml del reactivo FeCl_3 al 12%.
- Se agita inmediatamente y lentamente.
- Se deja por 10-15 minutos antes de interpretar los resultados, se agita ocasionalmente.

Si es negativa:

- No hay precipitado dentro de los 15 minutos, o el precipitado se va a disolver cuando se agita.
- El ión hierro esta presente en exceso.
- Hacer la prueba con las bacterias.

Si es positiva:

- El precipitado no se disuelve o es claro durante 10-15 minutos agitando.
- Los iones de hierro no están en exceso.
- Se titula FeCl_3 para determinar la cantidad óptima de reactivo que necesita para ver si está en exceso.

3. Titulación del Reactivo de FeCl₃.

(a) Se preparan tubos con cultivos puros de 1.0ml, se agregan rápidamente a cada uno de ellos 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 ml

(b) Se agita inmediatamente.

(c) Se dejan por 10-15 minutos antes de interpretar los resultados se agitan ocasionalmente.

(d) El nivel de concentración más pequeño de FeCl₃ que produce una solución clara se indica como iones Fe^{III} en exceso. Se usa esta cantidad como prueba (muestra problema).

(e) Hacer la prueba sobre los microorganismos.

4. Control positivo.

(a) Hay un precipitado muy pesado, después de 10-15 minutos se agita ocasionalmente.

(b) El hipurato se hidroliza.

El método para los microorganismos a prueba.

1. Se pone una cantidad apropiada del reactivo a todos los tubos.

2. Se agitan lentamente.

3. Se dejan 10-15 minutos antes de la interpretación de los resultados, agitando.

BIBLIOGRAFIA

Blaser, M.J., Hardesty, H.L., Powers, B. and Wang, W.L. 1980. Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in biological milieus. *Journal of Clinical Microbiology* 11, 309-313.

Blaser, M.J., Cravens, J., Powers, B.W., Laforce, F.M/ and Wand, W.L.L. 1979. *Campylobacter* enteritis associated with unpasteurized milk. *The American Journal of Medicine* 67, 715-718.

Botton, F.J., Hutchinson, D.N., Parker, G. (1987). *Campylobacter*: what are we missing *J. Clin. Path.* 40p. 702-703.

Botton, F.J., HGutchinson, D.M., Parker, G. 1988. Reassessment of selective agars and filtration technique for isolation of *Campylobacter* species from faeces. *Eur. J. Clin. Microbiol. Immunol.* Dis 7 p. 155-160.

Butzler, J.P. and Skirrow, M.b. 1979. *Campylobacter* enteritis. *Clinics in Gastroenterology*. 8, 737-765.

Goosens, H., De Boeck, M., Coignau, H., Vlaes, P., Van der Borne, C., Butzler, J.P. 1986. Modified selective medium for isolation of *Campylobacter* spp from faeces. Comparison with preston Medium A Blood free Medium and Filtration system *J. Clin. Micro* 24. p. 840-843.

Guerrant, M.D., Lahtita, R.G., Winn Jr., W.C., Roberts, R.B. 19978. *Campylobacteriosis* in man: Pathogenic mechanisms and review

in 91 Bloodstream infections. The American Journal of Medicina. 65. 584-592.

Gun Munro, J., Rennie, R.P., Thorneley, J.H., Richardson, H.L., Hodge, D., Lynch, J. 1987. Laboratory and Clinical evaluation of isolation Media for *Campylobacter jejuni*. J. Clin. Micro. 25 p. 2274-2277.

Harvey, S.M. 1980. Hippurate hydrolysis by *Campylobacter fetus*. Journal of Clinical Microbiology. 11. 435-437.

Herbert, G.A., Hollis, D.G., Weaver, R.E., Karmali, M.A., Simor, A.E., Roscoe, M., Fleming, P.C., Smith, S.S., Lanes, J. 1986. Evaluation of blood free, charcoal based, selective medium for isolation of *Campylobacter* organisms from faeces. J. Clinical Microbiology 23. 456-459.

Karmali, M.A. and Fleming, P.C. 1979. *Campylobacter enteritis*. Canadian Medical Association Journal. 120. 1525-1532.

Morris, J.A. and Park, R.W.a. 1971. The isolation of microaerophilic vibrios. "Isolation of Anaerobes" Edited by Shapton, D.A. and Board, R.G. Academic Press, London. Pages 207-217.

Smibert, R.M. 1978. The genus *Campylobacter*. Annual Review of Microbiology. 32. 673-709.

Ullman, U. 1979. Methods in *Campylobacter*. Methods in Microbiology. 13. 435-452. (chapter 10), Edited by Bergan, T. and Norris, J.R. Academic Press, London.

Veron, M. and Chatelain, R. 1973. Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Seblad and Veron and designation of the newtype strain for the species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylos) Seblad and Veron. International Journal of Systematic Bacteriology. 23, 122-134.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

1. Agregue 25 gr de muestra en un recipiente de boca ancha de 500ml, el cual contenga 225ml de Agua de Peptona Buffer (BPW). Si la muestra no se dispersa fácilmente en la BPW entonces mézclela en una batidora u homogenizador mecánico por 2 minutos. Incube durante 3 semanas a 4°C.
2. Transfiera con una asa de platino de la superficie del Caldo Enriquecido a la superficie de Agar C.I.N. después de 1, 2 y 3 semanas. Incube placas a 30°C y observe si se presentan colonias características de *Yersinia* después de 24 horas.
3. Escoja con el asa de inocular estéril, dos o más de cada tipo de colonias sospechosas del Agar C.I.N. a medio inclinado de Agua Triple de Azúcar y Hierro (TSI), a una placa del Medio MacConkey y a Caldo de Urea.
4. Incube los medios a 30°C durante 24-72 horas. Anote las reacciones descritas a continuación:

Colonias típicas - color rojo oscuro con una zona clara rodeándolas; con un margen entero y la superficie llana; algunas especies tienen márgenes y superficies irregulares.

Identificación de Especies de *Yersinia*.

	Sacarosa	Ramosa	Melibiosas	Movilidad	Urea
	22°C, 37°C				
<i>Y. enterocolitica</i>	+	-	-	+	-
<i>Y. frederiksenii</i>	+	+	-	+	-
<i>Y. intermedia</i>	+	+	+	+	+
<i>Y. kristensenii</i>	-	-	-	+	+
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	-	+	+	+	-

Medios de Cultivo.

Agua de Peptona Buffer

Peptona	10 gr/lit
Cloruro de sodio	5 gr/lit
Fosfato disódico	3.5 gr/lit
Fosfato monopotásico anhidro	1.5 gr/lit
pH	7.2 (aproximadamente)

Disuelva los ingredientes en agua destilada y vierta porciones de 225ml de la solución en botellas de boca ancha de 500ml con tapa de rosca. Esterilize por medio de autoclave a 15 psi durante 15 minutos.

Agar de C.I.N. (Agar de Cefusulodine-Irgazan-Novobiocin)

Peptona	20 gr/lt
Extracto de Levadura	2 gr/lt
Manitol	20 gr/lt
Acido Pirúvico (sal de sodio)	2 gr/lt
Cloruro de Sodio	1 gr/lt
Sulfato de Magnesio 7H ₂ O	0.01 gr/lt
Dexocyclato de Sodio	0.5 gr/lt
Agar	12 gr/lt
Agua Destilada	949 ml

Calentar para disolver los ingredientes. Enfriar a 80°C y agregar 1 ml de una solución 0.04% de Irgazan (Ciba-Geigy en etanol al 95%). Mezclarlo bien y enfriar a 50-55°C. Se agregan las siguientes soluciones:

Hidróxido de Sodio 5N	1 gr/lt
Rojo Neutro 3mg/ml	10 gr/lt
Cristal Violeta 1mg/ml	10 gr/lt
Cefuslodin (Abbott a Takeda) 1.5mg/ml	10 gr/lt
Novobiocin (Upjohn) 0.25mg/ml	10 gr/lt

Se agregan 10 ml de cloruro de estroncio 10%, esterilizado por filtración. Modifica el pH a 7.4

Agar Triple Azúcar y Hierro.

Extracto de Carne	3 gr/lt
Extracto de Levadura	3 gr/lt
Peptona	20 gr/lt
Cloruro de Sodio	5 gr/lt
Lactosa	10 gr/lt
Sucrosa	10 gr/lt
Glucosa	1 gr/lt
Citrato Férrico	0.3 gr/lt
Tiosulfato de Sodio	0.3 gr/lt
Rojo de Fenol 0.2%	12 ml
Agar	12 gr/lt

pH 7.4

Disuelva los ingredientes en agua tibia, lleve la solución a punto de ebullición para disolver el Agar. Ponga porciones de 10 ml en

botellas tipo universal y esterilice en autoclave a 15 psi (1.0 Kg/cm) durante 15 minutos. Incline las botellas al empujar para producir medios inclinados.

Fermentación de Azúcares.

Caldo de Rojo Fenol.

Peptona	10 gr/lit
Extracto de Carne	1 gr/lit
Cloruro de sodio	5 gr/lit
Rojo Fenol	0.018 gr/lit

Disuelva los ingredientes en agua destilada. Ponga porciones de 10 ml en botellas tipo universal y esterilice en autoclave a 15 psi durante 15 minutos. Prepare los azúcares y esterilícelos en autoclave a 10 psi durante 20 minutos o por filtración múltiple. Poner la cantidad de azúcar a concentración final de 0.5-1.0%.

BIBLIOGRAFIA.

- Aulisio, C.C.G., Mehlman, I.J. and Sanders, A.C. 1960. A rapid method for rapid recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* foods. *Appl. & Env. Microbiol.* 39, 135-140.
- Berche, P.A. and Carter, P.B. 1982. Calcium requirement and virulence of *Y. enterocolitica*. *J. Med. Microbiol.* 15, 277-284.
- Bhaduri, S., Conway, L.K. and Lachica, R.V. 1987. Assay of crystal violet binding for rapid determination of virulent phage-typing clones of *Y. enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.* 25, 1079-1082.
- DeBoer, E. and Seldan, W.M. 1987. Comparison of methods for isolation of *Y. enterocolitica* from porcine tonsils and pork. *Int. J. Food Microbiol.* 5, 95-101.
- Fukushima, H. 1985. Direct isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* from meat. *Appl. & Env. Microbiol.* 50, 710-712.
- Fukushima, H. 1987. New selective agar medium for isolation of virulent *Y. enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.* 39, 133-136.
- Greenwood, M.H. and Hooper, W.L. 1985. *Yersinia* spp. in foods and related environments. *Food Microbiology*, 2, 163-209.

Greenwood, M.H. Hooper, w.L. 1988 The use of alkalinity and incubation at 9°C for improved recovery of *Yersinia* spp. *Epidemiology and infection* in press.

Greenwood, M.H. and Hooper W.L. Improved recovery of *Yersinia* spp. from milk. In preparation.

Jagow, J. and Hill, W.E. 1986. Enumeration by DNA colony hybridization of virulent *Y. enterocolitica* colonies in artificially contaminated food. *Appl. & Env. Microbiol.* 51, 441-443.

Shiemann, D.A. 1982. Development of a two-step enrichment procedure for recovery of *Y. enterocolitica* from food. *Appl. & Env. Microbiol.* 43, 14-27.

Schiemann, D.A. 1982. Comparison of enrichment and plating media for recovery of virulent strains of *Y. enterocolitica* from inoculated beef stew. *J. Food Prot.* 46, 957-964.

Walter, S.J. and Gilmour, A. 1986. A comparison of media and methods for the recovery of *Y. enterocolitica* and *Y. enterocolitica* like bacteria from milk containing simulated raw milk microfloras. *J. Appl. Bact.* 60, 175-183.

ENUMERACION DE AEROMONA HIDROFILA

Preparar muestra de alimento como se describe en la sección de Técnicas Generales.

Conteo Total.

1. Se usa el método de siembra por extensión en superficie.
2. Utilizar cajas petri que contengan 15 ml de Agar de Almidón-Ampicilina ó Agar Aeromonas (Oxoid).
3. Pipetear 0.1 ml de muestra diluida en la superficie del agua y extender el inóculo utilizando un bastón de cristal estéril. Se deben preparar placas en duplicado para cada dilución, luego deben secarse e incubarse a 28°C (temperatura ambiente) por 24 horas.
4. Si se utilizó el Agar de Almidón-Ampicilina, al final de la incubación se ponen 5 ml de yodo lugol sobre las colonias. Se cuentan todas las colonias que tengan 3-5mm de diámetro, con una zona clara que produzcan amylasa y que sean de color amarillo o miel.
5. Si se utilizó Agar de Aeromonas (Ryans), se cuentan todas las colonias que sean de color verde oscuro. Se cuentan con el asa de platino estéril, 2 ó más muestras de cada tipo de colonia sospechosa de el Agar AAA & AA, a medios para pruebas bioquímicas.

Pruebas Bioquímicas

Tinción de Gram	Rápido Gram Negativo
Movilidad	Positiva.
Oxidasa	Positiva
Catalasa	Positiva
DNAsa	Positiva.
Resistente al agente Vibriostat 0/129	
Resistente a Novobiocin.	

Medios de Cultivo

Caldo de Soya Triplicasa con Ampicilina (TSBA)	
Muestra	TSBA
10 gr	50ml
20 gr	100 ml

Incubar a 35°C por 24 horas. Resembrar por estrias en Agar MacConkey y Agar Kimer-Ssoots e incubar a 35°C por 24 horas.

Caldo de Rimler Shooy's Modificado (MRSB).

Maltosa	3.5 gr/lt
L-Cysteina Hidrocloruro	0.3 gr/lt
Sales de Bilis No. 3	1 gr/lt
Extracto de Levadura	3 gr/lt
Cloruro de Sodio	5 gr/lt
Azul de Bromotimol	0.03 gr/lt

pH 7.0

Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Agregar 0.005 gr/lt de Novobiocina esterilizada por filtración. El enriquecimiento también puede hacerse con 25 gr en 225 ml de medio de enriquecimiento.

Aislamiento**Agar MacConkey Manitol Ampicilina (MMA).**

Agar Base MacConkey + 1% de Manitol y 30 microgramos de Ampicilina por ml. Sembrar por estrias o por extensión en superficie e incubar a 28°C por 18-24 horas.

ENUMERACION DE HONGOS Y LEVADURAS

- a. Preparar muestras como se describe en "Técnicas Generales". Puede utilizarse Agar 0.2% como diluyente en vez de la peptona.
- b. Pipetear 1 ml de las diluciones preparadas a 2 grupos de cajas petri en duplicado:
- c. Vaciar en uno de los grupos de cajas Agar de Extracto de Levadura Glucosa Oxytetraciclina Gentamicina.
- d. Vaciar en el otro grupo de platos Agar Czopek Dox 40% Sucrosa, este medio es específico para el conteo de hongos y levaduras que requieren una baja Aw.
- e. En adición a los 2 grupos de cajas, pipetear 0.1 ml de cada dilución a cajas en duplicado conteniendo Agar NY 40% conteniendo la dilución uniformemente sobre la superficie del agar.
- f. Incubar a 27°C por 5-7 días, en posición correcta.
- g. Contar el número de colonias formando unidades de hongos levaduras, y calcular el número por gramo de muestra.

Medios de Cultivo

Diluyente Agar 2%

Disolver 2 gr de Agar en 1000 ml de agua destilada. Hervir para disolver el agar. Transferir a botellas en volúmenes de 90 o 9 ml y esterilizar en autoclave a 110 psi por 20 minutos.

Peptona 0.1%

Disolver 1 gr de peptona en 1000 ml de agua destilada. Transferir a botellas volúmenes de 90 o 90 ml y esterilizar en autoclave a 15 psi por 15 minutos.

Agar de Extracto de Levadura.	
Extracto de Levadura	3 gr/lit
Extracto de Malta	5 gr/lit
Glucosa	10 gr/lit
Agar	12 gr/lit
Cloranfenicol (250ppm)	2 ml/lit

Disolver los ingredientes en agua destilada y hervir para disolver el agar. Agregar el cloranfenicol, mezclar bien y transferir a volúmenes de 750 ml. Esterilizar en autoclave a 15 psi por 15 minutos.

Agar Czopek dox + 40% Sucrosa

Nitrato de Sodio	2 gr/lit
Cloruro de Potasio	0.5 gr/lit

Glicerofosfato de Magnesio	0.5 gr/lt
Sulfato Ferroso	0.01 gr/lt
Sulfato de Potasio	0.35 gr/lt
Sucrosa	440 gr/lt
Cloranfenicol (250ppm)	5 ml
Agar	12 gr
pH	6.8

Disolver los ingredientes en agua destilada y hervir para disolver el agar. Transferir a botellas con tapón de rosca y esterilizar a 10 psi por 10 minutos.

Agar My 14g.	
Extracto de Malta	12 gr/lt
Extracto de Levadura	3 gr/lt
Glucosa	400 gr/lt
Agar	15 gr/lt

Disolver los ingredientes en agua destilada (600ml). Dividir el agua en 2 recipientes. A uno de ellos agregar el agar, Extracto de malta y extracto de levadura y hervir para disolver el agar. Al otro se le agregan los 400 gr de azúcar y se calienta suavemente hasta que el azúcar se haya disuelto completamente, Mezclar la solución de azúcar con la del agar y transferir a botellas con tapón de rosca, en volúmenes de 250 ml. Esterilizar en el autoclave a 10 psi por 10 minutos. Cuando el agar se haya enfriado a 50°C, transferirlo a cajas de petri estériles (15-20 ml).

Agar de Extracto de Levadura Oxitetraciclina Gentamicina

Extracto de Levadura	5 gr/lt
Glucosa	20 gr/lt
Cloranfenicol (soln. acuosa 0.5% p/v)	10 ml
Gentamicina (soln. acuosa 0.5% p/v)	15 ml
pH	6.9

Disolver los ingredientes en agua destilada caliente y hervir para disolver el agar. Transferir en Volúmenes de 80ml y esterilizar a 15 psi por 15 minutos. Enfriar a 50-55°C y a cada volumen de 80ml agregar:

- 10 ml de soln. acuosa al 1% de Hidrocloruro de Oxitetraciclina esterilizada por filtración.
- Cuando se requiera impedir la existencia de una copiosa cantidad de micelio aéreo: 10 ml de solución acuosa al 0.04% de rosa de bengala, esterilizada por filtración. Cuando esto no se

requiere agregar 10 ml de agua destilada estéril para completar el volumen.

Esterilización de la superficie de las muestras para el examen microbiológico.

Algunas veces se recomienda esterilizar la superficie de las muestras con el fin de estudiar los hongos y levaduras que estén creciendo dentro del producto. Esto puede hacerse como sigue:

- a. Lavar las muestras con hipoclorito de sodio al 1-2 por 5 minutos.
- b. Enjuagar con agua destilada estéril 4 ó 5 veces.
- c. La muestra entonces puede ser homogenizada con el diluyente como se describe en Técnicas generales, o puede ponerse directamente en el medio de cultivo. Si se utiliza el segundo método entonces la muestra debe ser secada antes de usarla.

