



UNIVERSIDAD DE QUINTANA ROO

División de Ciencias e Ingenierías

**METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA EL
AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS
PATÓGENOS EN AGUAS Y ALIMENTOS**

TRABAJO MONOGRÁFICO
Para obtener el grado de
Licenciado en Ingeniería Ambiental

PRESENTA
Francisco Javier Sánchez Camarillo

SUPERVISORES
Q.F.B. José Luis González Bucio
M.C. Juan Carlos Ávila Reveles
Dr. José Manuel Carrión Jiménez

Chetumal, Quintana Roo 2004

Ø 43826



UNIVERSIDAD DE QUINTANA ROO

Trabajo monográfico elaborado bajo la supervisión del comité de asesoría y aprobado como requisito parcial, para obtener el grado de:

LICENCIADO EN INGENIERÍA AMBIENTAL

COMITÉ:

SUPERVISIÓN: _____


Q.F.B. José Luis González Bucio

ASESOR: _____


M.C. Juan Carlos Ávila Reveles

ASESOR: _____


Dr. José Manuel Carrión Jiménez

Chetumal, Quintana Roo. Noviembre 2004.

Dedicatoria

Dedico la realización de este trabajo:

A mi esposa:

Bella Leby Mex Herrera

A quien amo y respeto por su comprensión y confianza depositada en mi, y por todo el amor que me ha brindado.

A mis hijos:

Gabriela, Liliana, Francisco Javier, Alejandra, y Bella Leby, por darme confianza para poder ser un hombre capaz de trazar un camino y seguirlo hasta conseguir la meta, y hacerme comprender que la vida no es algo que se nos da ya hecho, sino que es la oportunidad para hacer las cosas bien hechas.

Agradecimientos

A mis padres:

Por haberme concebido y por proporcionar la fe y la fuerza necesaria para culminar uno de los anhelos más importantes de mi vida; mi formación profesional.

A mi esposa y a mis hijos:

A quien amo y respeto, les agradezco infinitamente todo su amor y apoyo, comprensión y confianza depositada en mí; les agradezco la realización de este trabajo, ya que significa el inicio de una de las etapas más importantes de mi vida.

A mis amigos, compañeros alumnos y maestros:

Gustavo, Fermín, Noe, Octavio, Sissi, Bojorques; grandes compañeros a lo largo de toda la carrera profesional. A los maestros Víctor Hugo, José Luis, Juan Carlos; Martín Ribero; que fueron parte importante de mi formación profesional.

Contenido

	Página
Lista de tablas	I
Presentación	1
Introducción	
Recomendaciones generales para el trabajo de laboratorio	3
Preparación del área de trabajo	3
Preparación del material y de las muestras	4
Selección, preparación y medición o pesada de la alícuota	4
Preparación de las diluciones	5
Incubación	5
Capítulo 1	
Dilución de la muestra para su análisis microbiológico	6
Objetivo	6
Campo de aplicación	6
Referencias	6
Fundamento	6
Materiales y equipo	6
Reactivos	7
Condiciones ambientales	7
Procedimiento	7
Medidas de seguridad	9
Medidas de control de calidad	9

Capítulo 2

Método para la cuenta de Mesofílicos aerobios en placa	10
Objetivo	10
Campo de aplicación	10
Referencias	10
Fundamento	10
Materiales y equipo	11
Reactivos y medios de cultivo	11
Condiciones ambientales	11
Procedimiento	11
Cálculos	12
Interpretación e informe de resultados	14
Medidas de seguridad	14
Medidas de control de calidad	14

Capítulo 3

Determinación y cuenta de bacterias coliformes en muestras de aguas y alimentos	16
Objetivo	16
Campo de aplicación	16
Referencias	16
Fundamento	16
Materiales y equipo	17
Reactivos y medios de cultivo	17
Condiciones ambientales	18
Procedimiento	18
Cálculo del método	19
Técnica del NMP	19
Cálculo e Interpretación de resultados	20
Medidas de seguridad	20

Capítulo 4

Determinación de coliformes fecales por la técnica del Número Más Probable, (presuntiva <i>E. coli</i>)	21
Objetivo	21
Campo de aplicación	21
Referencias	21
Fundamento	21
Materiales y equipo	22
Reactivos y medios de cultivo	22
Condiciones ambientales	22
Procedimiento	22
Cálculo e Interpretación de resultados	23
Prueba confirmativa de <i>Escherichia coli</i> (Método EC-MUG)	24
Cálculo e Interpretación de resultados	24
Procedimiento para alimentos	25
Cálculo e interpretación de resultados	25
Medidas de seguridad	25

Capítulo 5

Determinación del género <i>Salmonella sp</i> en alimentos	29
Objetivo	29
Campo de aplicación	29
Referencias	29
Fundamento	29
Materiales y equipo	30
Reactivos y medios de cultivo	30
Condiciones ambientales	31
Descripción de la actividad	31
Cálculos	35
Interpretación e informe de resultados	35
Medidas de seguridad	35
Medidas de control de calidad	35

Capítulo 6

Método para la determinación de <i>Staphylococcus aureus</i> en alimentos	37
Objetivo	37
Campo de aplicación	37
Referencias	37
Fundamento	37
Materiales y equipo	38
Reactivos y medios de cultivo	38
Condiciones ambientales	38
Descripción de la actividad	39
Cálculos	40
Interpretación e informe de resultados	41
Medidas de seguridad	41
Medidas de control de calidad	41

Capítulo 7

Aislamiento e identificación de <i>Vibrio cholerae</i> en alimentos y agua blanca	42
Objetivo	42
Campo de aplicación	42
Referencias	42
Fundamento	42
Materiales y equipo	42
Reactivos y medios de cultivo	43
Condiciones ambientales	43
Procedimiento en muestras de alimentos	44
Procedimiento en muestras de aguas blancas	46
Interpretación e informe de resultados	47
Medidas de seguridad	47
Medidas de control de calidad	48

Capítulo 8

Conclusiones y Recomendaciones	49
Conclusiones	49
Recomendaciones	50

Anexo 1	Preparación de medios de cultivo	51
----------------	----------------------------------	----

Anexo 2	Preparación de reactivos	69
----------------	--------------------------	----

Lista de Tablas

	Página
Tabla 1 Cálculo de los valores de la cuenta en placa	13
Tabla 2 Índice del NMP para varias combinaciones de resultados positivos y negativos, cuando se usan 5 tubos con 20 ml muestra de agua	24
Tabla 3 Índice del MNP para 100 ml de muestra cuando se usan 5 porciones en cada una de las tres diluciones con series geométricas, (10 ml, 1 ml, 0.1 ml)	25
Tabla 4 NMP/ gr o ml de coliformes fecales para alimentos	26
Tabla 5 Interpretación de resultados de las reacciones bioquímicas y serológicas para Salmonella	34
Tabla 6 Reacciones bioquímicas y serológicas del género Salmonella	35
Tabla 7 Calculo de colonias de Estafilococo para probar	38
Tabla 8 Reacciones bioquímicas y serológicas de Vibrio colera O1	47

PRESENTACIÓN

El Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP), desde 1980 ha venido prestando sus servicios en el ámbito de la microbiología sanitaria en conjunto con las jurisdicciones que son las encargadas del monitoreo de los expendedores de alimentos y del muestreo en todo el estado. Las actividades del LESP son las realizar análisis microbiológicos de aguas y alimentos y otros productos, para poder garantizar la calidad sanitaria de los mismos. Yo como Analista Químico, realizo todas estas actividades en el LESP, desde 1991 hasta la fecha, considerando que son de gran importancia para la población consumidora de alimentos, y de otros productos.

Los servicios analíticos constituyen uno de los elementos fundamentales de todo programa de inocuidad y de control de calidad de los alimentos. El Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP), reconoce que es la piedra angular de todo programa tendiente a garantizar la inocuidad de los alimentos; considerarlo un simple servicio de apoyo constituye un grave aunque muy entendido error.

El laboratorio interviene en muchos aspectos del control sanitario de los alimentos. La total certidumbre respecto a que un alimento no tiene contaminantes químicos o biológicos, y que cumple con las especificaciones o normas respectivas, únicamente puede ser proporcionada en casi la totalidad de los casos, por el laboratorio. En el supuesto de que un brote de Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA), es el laboratorio el que confirma que un alimento determinado fue el vehículo responsable, mediante el estudio de muestras de materias primas o el alimento mismo. Asimismo el LESP, desempeña un papel especial en los modernos enfoques destinados a mejorar o garantizar la calidad e inocuidad de los alimentos, por ejemplo, en el Análisis de Riesgos y Peligros Potenciales-Determinación de Puntos Críticos de Control (ARPC).

El Laboratorio de Microbiología de Alimentos del LESP, ocupa un lugar primordial, entre los servicios analíticos. En efecto, está demostrado que las ETA de origen biológico son más frecuentes que las de origen químico y que la conservación de la calidad sanitaria

y el tiempo de vida del producto alimenticio están, indiscutiblemente ligados a la existencia de microorganismos alterantes, o producto metabólico. Es el LESP, el encargado de verificar la potencia o actividad de los agentes antimicrobianos, aceptados o prohibidos, usados por la industria en la higienización de sus instalaciones o para prolongar el tiempo de conservación de sus productos.

La pretensión máxima del LESP consiste en controlar y asegurar la calidad de sus resultados, establecer la calidad de éstos es una tarea dispendiosa que requiere del compromiso y dedicación del encargado del Laboratorio y de todo el personal, del cual formo parte como analista químico de aguas y alimentos, y del control de calidad de los procesos analíticos.

Este trabajo pretende ser de utilidad como fuente de consulta para los químicos que se dediquen a la microbiología alimentaria, y para los profesionales que en ellos se desempeñen, me sentiría profundamente complacido.

Espero que los usuarios de este trabajo me hagan llegar sus comentarios, ideas y críticas, valiosos aportes que me permitirán seguir mejorando en mi trabajo futuro. Este trabajo no hubiese sido posible sin el generoso apoyo y permanente aliento proporcionado por la representante del LESP, igualmente mi reconocimiento a los compañeros que laboran en el mismo por las facilidades otorgadas.

INTRODUCCIÓN

Recomendaciones generales para el trabajo de laboratorio

Las técnicas de análisis microbiológico cuantitativo se desarrollan siguiendo una secuencia cuyos diferentes estudios deben ser cuidadosamente atendidos en cada renglón. En general, pueden señalarse los siguientes.

Preparación del área de trabajo

Preparación del material y de las muestras

Selección, preparación y medición o pesada de la alícuota

Preparación de las diluciones

Incubación

La mesa sobre la cual va a ejecutarse el análisis microbiológico estará protegida de corrientes de aire y de la incidencia de luz solar.

Deberán cumplirse las siguientes condiciones.

Preparación del área de trabajo.

- a).- Disponer con una mesa de trabajo con cubierta de acero inoxidable, material plástico liso resistente al calor, humedad y corrosión, o de madera impermeabilizada, en ese orden de prioridades. Mantenerla en cualquier caso, limpia y en buen estado de conservación.
- b).- El fondo de la mesa medirá preferentemente de 60 a 70 cm con acceso a fuentes de gas, energía eléctrica y agua.
- c).- Contar con suficiente iluminación, natural o artificial, sin reflejos molestos sobre el analista.
- d).- Evitar el hacinamiento de personas en torno al área de trabajo, o la realización de otras actividades en la zona contigua, como lavar o envolver material mientras se efectúan los análisis.

- e).- distribuir los materiales dentro del área de trabajo en tal forma que el movimiento del material se realice de izquierda a derecha y siempre dentro del espacio suficiente para realizar las maniobras con fluidez.
- f).- al concluir la última actividad en la mesa de trabajo, proceder a su desinfección, de preferencia con alcohol al 70% o benzal al 5%.
- g).- El analista estará provisto de bata de color claro, limpia y en buen estado de conservación.
- h).- Bajo ninguna circunstancia se deberá fumar, comer, beber o hablar en tanto se realiza el trabajo. La barba crecida y la cabellera abundante suelta, constituyen fuentes de contaminación durante el manejo de las muestras y de los medios de cultivo.
- i).- Antes de iniciar el trabajo práctico, definir con claridad las técnicas por utilizar y el volumen de muestras por analizar.
- j).- Conservar fuera de refrigeración, estrictamente el mínimo de tiempo necesario, los alimentos perecederos mientras se reciben las claves del laboratorio.

Preparación del material y de las muestras.

- a).- Estimar el número de cajas, pipetas de diferentes capacidades y frascos o tubos de dilución, que se requieran de acuerdo con la muestra por analizar.
- b).- Anotar clave, fecha y la información pertinente que identifique cada caja dentro del estudio. Tomar en cuenta que a partir de una muestra puede ser necesario investigar más de un grupo microbiano, lo que implica el empleo de diferentes medios de cultivo, hacer las anotaciones en la tapa de la caja procurando que sean las mínimas necesarias.
- c).- Cuando se trate de muestras congeladas, colocarlas en refrigeración durante la noche anterior, antes de retirar de ellas la alícuota por examinar.

Selección, preparación y medición o pesada de la alícuota

La muestra colectada de un lote debe suponerse representativa de este, para lo cual existen normas y directrices en diversas publicaciones. Esa muestra, a su vez, es objeto de un muestreo al extraer de ella la alícuota que va a ser analizada. Habrá por tanto, que retirarla cuidando de no incurrir en contaminación.

Efectuar la medición o pesada de la alícuota en la mesa de trabajo con el mechero encendido a unos 30 cm de distancia y dentro de un orden y cuidando que reduzcan al mínimo cualquier contaminación del producto. El sobrenadante de este conviene conservarlo en refrigeración hasta llevar las placas a la incubadora.

La toma y pesada de la alícuota a partir de la muestra requiere del empleo de utensilios estériles, manuales y eficientes. Según la consistencia, tamaño y tipo de empaque del alimento, pueden utilizarse cuchillos o cucharillas metálicas, abate lenguas, tijeras o pinzas. Las manos no estarán en contacto bajo ninguna condición con estos materiales.

Preparación de las diluciones.

La mayoría de las veces, es necesario preparar diluciones de la muestra para llevar a cabo el recuento de los microorganismos que contenga, por dos razones.

a).- El producto puede contener una cifra elevada, de tal suerte que el recuento de las colonias en las placas solo puede ser satisfactoria en alguna de las diluciones.

b).- La muestra sólida o insuficiente fluida, no puede incorporarse directamente al medio de cultivo.

Incubación.

El proceso de incubación de los cultivos reviste una importancia decisiva en los resultados de los análisis microbiológicos. Numerosas experiencias muestran la magnitud de una variabilidad claramente definida en el caso de las pruebas cuantitativas, cuando las condiciones en las que se lleva a cabo la incubación no son debidamente controladas.

Al restringirse el desarrollo de un determinado grupo de microorganismos si la temperatura de incubación se eleva o disminuye con respecto a su óptima, otros grupos de microorganismos presentes pueden manifestarse con preponderancia. El recuento obtenido, será diferente si tal restricción por defecto de la incubación, no hubiera ocurrido.

Capítulo 1

Dilución de la muestra para su análisis microbiológico

Objetivo

Establecer el método para la preparación de diluciones necesarias de una muestra para su análisis.

Obtener una distribución uniforme de los microorganismos presentes en una muestra mediante diluciones de forma decimal para su contabilidad.

Campo de aplicación

Este procedimiento se aplicará a muestras de alimentos y aguas cuando se requieran. Dependiendo de la naturaleza de la muestra será el proceso a seguir para la preparación de su dilución primaria.

Referencias

NOM-110-SSA1-1994, Preparación y dilución de muestras de aguas y alimentos para su análisis microbiológico.

Técnicas generales para análisis bacteriológico de alimentos. Manual del Laboratorio Nacional de Salud Pública, 1979.

Fundamento

Se basa en la preparación de diluciones primarias, para obtener una distribución uniforme de los microorganismos presentes en la porción de muestra, obteniendo posteriormente diluciones decimales adicionales las cuales tienen por objetivo reducir el número de microorganismos por unidad de volumen.

Materiales y Equipo

Tubos de ensaye de 16 x 150 mm con tapón de rosca.

Pipetas bacteriológicas de 1, 2 y 5 ml. Graduadas con filtro de algodón.

Frascos de nalgene de 250 ml con tapa de rosca.

Utensilios estériles (cuchillos, cucharas, pinzas y tijeras).

Marcadores permanentes.

Horno para esterilizar con temperatura mínima de 170 °C.

Autoclave con termómetro y manómetro

Licadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato o bien un homogeneizador peristáltico (Stomacher)

Vasos para licadora con tapa estériles

Balanza electrónica con sensibilidad de 0.1 gramos

Mechero.

Reactivos

Solución Buffer (solución amortiguadora).

Agua peptonada

Los reactivos y medios utilizados deberán ser de grado analítico.

Condiciones ambientales

Las diluciones tanto primarias como secundarias de las muestras se deberán realizar bajo condiciones de esterilidad, mediante el uso del mechero, evitando las corrientes de aire en el área durante el proceso.

Procedimiento

Preparación de la dilución primaria

A partir de muestras líquidas

-Para muestras líquidas no viscosas (agua, leche, refrescos, etc.) en las cuales la distribución de microorganismos es homogénea o fácilmente homogeneizable por medios mecánicos.

-Para muestras congeladas de un alimento originalmente líquido o licuable, fundir por completo en baño de agua de 40-45°C, un tiempo de 15 minutos. Y homogeneizar agitando vigorosamente.

-Agitar la muestra con al menos 25 movimientos de arriba a bajo en un arco de 30 cm en un tiempo de 7 segundos, tomar 10 ml de la muestra y diluir en 90 ml del diluyente,

en el momento de la descarga evitar el contacto entre la pipeta y el diluyente, 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:

- Las muestras sólidas o semisólidas congeladas, deben descongelarse en refrigeración de 4-8°C, durante 18 horas y no más de 24 horas antes de proceder a su análisis.
- Pesar una cantidad de 10 gr de la muestra por analizar en un recipiente o bolsa plástica estéril, adicionar un volumen de 90 ml del diluyente.
- Operar la licuadora o el homogeneizador peristáltico de 1 a 2 minutos, hasta obtener una suspensión homogénea y completa, según se indique en la técnica correspondiente a cada alimento.
- Permitir que las partículas grandes sedimenten y transferir la cantidad deseada, tomando de las capas superiores de la suspensión. Cuando la dilución primaria es viscosa o pegajosa, adicionar más diluyente, lo cual deberá tomarse en cuenta para las operaciones subsecuentes y expresión de resultados.

Preparación de las diluciones decimales adicionales

- Transferir 1 ml o un múltiplo de la dilución primaria 1+9 (10^{-1}), en otros recipientes conteniendo nueve veces el volumen del diluyente estéril, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente estéril, mezclar cada dilución como se menciona anteriormente.
- La selección de las diluciones que se vayan a preparar y de aquellas que se van a inocular, depende del tipo de alimento, que se este manejando
- Utilizar una pipeta para cada dilución, inoculando simultáneamente, las cajas petri estériles con las diluciones seleccionadas y el volumen que se transfiera no debe ser menor al 10% de la capacidad total de la pipeta.
- Si la pipeta es terminal y se transfiere un volumen de líquido equivalente a su capacidad total, escurrir aplicando la punte de la pipeta una sola vez en un área de la caja petri si liquido.

-Para aforar la pipeta, la punta de ésta debe apoyarse en el interior del cuello del tubo o frasco y mantenerse en posición vertical, a la altura de los ojos.

-El criterio para seleccionar las diluciones a preparar de acuerdo con el número de microorganismos esperado es

-Para la técnica del número más probable (NMP) 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 pueda contar de 25 a 250 colonias, en el método de determinación de bacterias aerobias por vaciado en placa. En el caso de otros grupos microbianos realizar las diluciones necesarias para establecer el rango de colonias especificado en la norma oficial mexicana correspondiente.

Duración del procedimiento

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

Medidas de seguridad

Utilizar bata de laboratorio, limpia y cerrada

Evitar el derrame de líquidos

Abrir los vasos de las licuadoras después de 1 minuto de reposo, para evitar los aerosoles

Medidas de control de calidad

Las diluciones deben ser preparadas inmediatamente antes del análisis y deben ser utilizadas para su inoculación dentro de los 20 minutos de su preparación.

Las mesas utilizadas durante el proceso se limpiarán antes y después de trabajar, con benzal al 5% o alcohol al 70%.

Capítulo 2

Método para la cuenta de mesofílicos aerobios en placa

Objetivo

Establecer el método para la determinación de organismos mesofílicos aerobios en muestras presentadas al laboratorio.

Estimar la cantidad de microorganismos viables presentes en una muestra que permita evaluar su calidad sanitaria.

Campo de aplicación

Este procedimiento se aplica como análisis básico a muestras de agua y alimentos, recepcionadas en el laboratorio, así como a materia prima, equipos envases y otros materiales, que debido a su contacto con los alimentos pudieran modificar la flora bacteriana de un alimento.

Referencias

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

Manual de Técnicas Generales para Análisis Bacteriológico de Alimentos. Laboratorio Nacional de Salud Pública. 1979.

Manual de Prácticas de Microbiología Sanitaria. Instituto Politécnico Nacional 2003

Ecología microbiana de los Alimentos. International commission on microbiological specifications for foods. Vol. II, 1980, Edt. Acribia, España.

Fundamento

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, presumiendo 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.

Materiales y Equipo

Tubos de ensaye de 16 x 150 mm con tapón de rosca.

Pipetas bacteriológicas de 1, 2 y 5 ml. Graduadas con filtro de algodón.

Frascos de nalgene de 250 ml con tapa de rosca.

Utensilios estériles (cuchillos, cucharas, pinzas y tijeras).

Marcadores permanentes.

Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de ± 1.0 °C.

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

Registrador mecánico o eléctrico.

Microscopio óptico.

Baño de agua con o sin circulación mecánica que mantenga la temperatura a 45 ± 1 °C.

Mechero.

Reactivos y Medios de cultivo

Solución Buffer (solución amortiguadora).

Agar Triptona- Extracto de levadura (agar cuenta estándar).

Agra Triptona-Extracto de Carne.

Los reactivos y medios utilizados deberán ser de grado analítico y para su preparación consultar, preparación de medios de cultivo y reactivos.

Condiciones ambientales

Esta determinación se realizará bajo condiciones de esterilidad, mediante el uso del mechero, evitando las corrientes de aire en el área durante el proceso.

Procedimiento

-Marcar las cajas con los datos necesarios, previamente a su inoculación (Clave de la muestra, Número de muestras y fecha, Dilución y tipo de determinación).

-Realizar el número de diluciones decimales de acuerdo al tipo de muestra a analizar.

- Transferir 1 ml de la muestra de las diluciones deseadas a las cajas de petri estériles desechables, apoyando la punta de la pipeta en el fondo de la caja petri mientras escurre el líquido, correr la prueba por duplicado.
- Agregar de 12 a 15 ml. Del medio fundido que deberá encontrarse en el momento del vaciado a una temperatura de $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y mezclar con la muestra con 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, 6 movimientos en el sentido contrario a las manecillas del reloj y 6 de atrás hacia delante, en una superficie lisa y horizontal, cuidando que el medio no moje la cubierta de las cajas y dejar solidificar. Utilizar como medio de cultivo el agar para cuenta estándar para muestra de alimentos, en el caso de muestras de aguas purificadas, potable y naturales utilizar el agar triptona con extracto de carne (AT).
- El tiempo transcurrido durante todo el proceso no deberá exceder de 20 minutos.
- Preparar una caja testigo con 12 ml del medio de cultivo utilizado para el control de esterilidad por cada diez cajas utilizadas.
- Incubar las cajas en posición invertida. Para muestras de alimentos incubar 48 horas a una temperatura de $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$. En caso de muestras de aguas incubar 24 horas, a la misma temperatura.
- En la lectura seleccionar las cajas petri de las diluciones que contengan desarrollo de 25 a 250 colonias para disminuir el error en la cuenta.
- Contar todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas (excepto los hongos y levaduras), incluyendo las colonias puntiformes. Utilizar el microscopio en los casos que no se pueda distinguir las colonias de las pequeñas partículas de alimento.

Cálculos

- Placas que se encuentren en el intervalo de 25 a 250 colonias.
Las placas de al menos una de tres diluciones debe estar en es intervalo. Cuándo una sola dilución esta en el intervalo apropiado, ver tabla 1, por ejemplo 1. Calcular la cuenta promedio por gramo o mililitro de dicha dilución y reportar.
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 tabla 1, ejemplo 2.

Con el fin de unificar criterios para el reporte de las cuentas en ensayos donde las placas presentan situaciones no contempladas en los ejemplares anteriores, se presentan las siguientes guías:

-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 de 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 el informe esta situación agregando la leyenda de "valor estimado". Ver tabla 1 ejemplo 3.

-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 las colonias. Contar por ejemplo, una cuarta parte o una mitad del área de la caja y multiplicar el valor obtenido por 4 o 2, respectivamente. Si solamente pueden contarse algunos cuadros, considerar que el fondo de un caja petri de 100 mm de diámetro contiene 56 cuadros de la cuadrícula del contador. Aclarar en el informe esta situación agregando la leyenda "valor estimado", ver tabla 1 ejemplo 4.

-Placas sin colonias

Cuando las placas de todas las diluciones no muestren colonias, reportar la cuenta en placa como menor que una vez el valor de la dilución más baja usada. Véase tabla 1 ejemplo 6.

-Placas corridas por duplicado, una con crecimiento dentro del intervalo adecuado y otra con más de 250 colonias. Contar ambas placas incluyendo la que está fuera del intervalo para determinar la cuenta en placa. véase tabla 1 ejemplo 7.

-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 del intervalo, contar el número de colonias de las cuatro placas para calcular la cuenta en placa. Véase tabla 1 ejemplo 8.

-Placas corridas por duplicado, ambas placas de una dilución dentro del intervalo y solo una de la otra dilución dentro del mismo. Contar las cuatro cajas incluyendo aquella con

menos de 25 o más de 250 colonias para calcular la cuenta en placa. Véase tabla 1 ejemplo 9.

Después de contabilizar las colonias en las placas seleccionadas, multiplicarla 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 solo aparezcan dos dígitos significativos al inicio de la cifra. Para redondear, eleva el segundo dígito al número inmediato superior cuando el tercer dígito de la derecha sea cinco o mayor; si el tercer dígito es cuatro o menos, reemplaza el tercer dígito con cero y el segundo dígito mantenlo igual.

Interpretación e informe de resultados

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

Medidas de seguridad

Utilizar bata del laboratorio, en caso de ingestión accidental de algún líquido, o quemadura proceder de acuerdo al procedimiento de bioseguridad del laboratorio y notificar al jefe del laboratorio.

Medidas de control de calidad

Se realizara una caja testigo del medio utilizado para cada 5 muestras analizadas, duplicados de muestras, así como el control ambiental del área y de las superficies de trabajo.

Tabla 1: Calculo de los valores de la cuenta en placa

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
	>250	238	25	
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	crec. Ext.	
6	0	0	0	<100 ^c
7	>250	240	24	250000
	>250	268	16	
8	>250	216	23	280000
	>250	262	42	
9	>250	215	20	230000
	>250	235	26	
	>250	275	32	
	>250	225	26	

a) Cuenta por arriba de 250 colonias.

b) Debe aclararse "valor estimado" por encontrarse los intervalos fuera del intervalo de 25 a 250 colonias.

c) Debe informarse de acuerdo a la menor dilución ensayada y contada.

Capítulo 3

Determinación y cuenta de bacterias coliformes en muestras de aguas y alimentos

Objetivo.

Establecer el método para la determinación de organismos coliformes en muestras de aguas y alimentos.

Establecer la técnica adecuada para la determinación dependiendo de la naturaleza de la muestra.

campo de aplicación

Este método se aplicará a muestras de aguas y alimentos presentadas al laboratorio, así como superficies de utensilios, envases o equipos utilizados en la elaboración de los mismos.

Referencias.

NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de organismos coliformes totales en placa.

NOM-112- SSA1-1994, Bienes y Servicios. Determinación de Bacterias Coliformes. Técnica del número más probable.

Métodos Normalizados. APHA 1992

Manual de Laboratorio de Microbiología Sanitaria, Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología, segunda edición, 2003

NOM-145-SSA1-1995. Productos cárnicos troceados y curados. Cárnicos curados y madurados. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Apéndice normativo B.

Fundamento.

El recuento de organismos coliformes puede realizarse mediante el empleo de medios sólidos, método que permite determinar el número de organismos coliformes presentes

en una muestra, utilizando para tal fin un medio selectivo en el que se desarrollan bacterias a 35°C en aproximadamente 24 horas, dando como resultado la producción de gas y ácidos orgánicos, los cuales viran el indicador de pH y precipitan las sales biliares del medio; o aplicando la técnica del número más probable (NMP), que se basa en la facultad que tienen las bacterias coliformes de fermentar la lactosa incubadas a una temperatura de 35°C durante un tiempo de 24 a 48 horas, resultando la producción de ácidos y gas el cual se manifiesta en las campanas de fermentación.

Materiales y Equipo

Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 1^\circ\text{C}$

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

Baño de agua con circulación mecánica que mantenga la temperatura a $45 \pm 1^\circ\text{C}$

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

Potenciómetro con escala mínima de 0.1 unidades de pH a 25°C

Mechero

Tubos de ensaye de 16 x 150 mm y de 22 x 200 mm con tapón de rosca

Pipetas bacteriológicas de 1, 2, 5, y 10 ml, graduadas con filtro de algodón estériles

Frascos de Nalgene de 250 ml con tapa de rosca

Campanas de fermentación

Gradillas para tubos de ensaye

Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro

Marcadores permanentes.

Reactivos y medios de cultivo

Solución reguladora de fosfatos

Agar rojo violeta-bilis-lactosa (RVBA)

Caldo lauril en concentraciones triple, 1.5 y sencilla

Caldo lactosa verde brillante bilis

Los reactivos y medios utilizados deberán ser grado analítico.

Condiciones ambientales

Esta determinación se realizará bajo condiciones de esterilidad, mediante el uso del mechero, evitando las corrientes de aire en el área durante el proceso.

Procedimiento

Técnica de placa vaciada para la determinación de organismos coliformes en muestras de alimentos

- Marcar las cajas con los datos necesarios, previamente a su inoculación: Clave de la muestra, Número de muestra y fecha, Dilución y tipo de determinación.
- Acondicionar la muestra y preparar sus diluciones decimales, según corresponda al tipo de alimento
- Colocar en cajas petri por duplicado 1 ml, o volumen decimal de la muestra o de sus diluciones decimales.
- Agregar de 12 – 15 ml del medio agar rojo violeta bilis fundido y mantenido a una temperatura de $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$. El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el momento en que se agrega el medio de cultivo no deberá exceder de 20 minutos.
- Mezclar adecuadamente el medio con la muestra con 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, 6 movimientos al sentido contrario de las manecillas del reloj, y 6 movimientos de atrás para adelante, dejar solidificar sobre una superficie plana y horizontal.
- Preparar una caja testigo con 15 ml del medio para control de esterilidad por cada diez cajas utilizadas en el vaciado. Después de que el medio solidifique agregar 4 ml del mismo medio de cultivo extendiéndolo en la superficie del medio inoculado.
- Dejar solidificar e incubar las cajas en posición invertida durante 24 horas a 35°C , posteriormente, Seleccionar las placas que contengan colonias de color rojo oscuro, con halo de precipitación y diámetro de 0.5 mm a 2.0 mm, contabilizar las cajas que se encuentren en un rango de desarrollo de 15 a 150 colonias.

Cálculo del método

-Placas que contienen entre 15 y 150 colonias

Separar las placas que contengan el número antes mencionado de colonias características en dos diluciones consecutivas. Contar las colonias presentes, calcular el número de coliformes por mililitro o gramo de la muestra, multiplicando el número de colonias por el inverso de la dilución correspondiente, tomando en cuenta los criterios mencionados en la NOM-092, "Método para la cuenta de mesofílicos aerobios en placa"

-Placas que contienen menos de 15 colonias características

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

-Placas con colonias no características.

Si no se observan colonias características reportar el resultado como menos de un coliforme por 1/d, por gramo o ml, donde d es el factor de dilución.

Interpretación e informe de resultados

-Informar: UFC/gr o ml el placa de agar rojo violeta bilis, incubadas por 24 horas a 35°C, en caso de emplear diluciones y no observar crecimiento en la muestra sin diluir, se informa utilizando como referencia la dilución mas baja utilizada.

Técnica del número mas probable(NMP), y la técnica de NMP para la determinación de organismos coliformes en muestras de aguas y hielos.

Para agua purificada, potable, y hielos.

Prueba presuntiva

-Agitar la muestra, transferir volúmenes de 20 ml de la muestra a cada uno de los cinco tubos que contienen 10 ml de caldo lauril triple.

-Incubar los tubos a $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Examinar los tubos a las 24 horas y observar si hay formación de gas, en caso de no observarse la presencia de gas, incubar durante 24 horas más.

Para aguas naturales y de uso recreativo

Prueba presuntiva

- Realizar diluciones antes de la siembra, utilizando cinco tubos con lauril concentración 1.5 y diez con lauril concentración sencilla.
- Agitar la muestra, transferir volúmenes de 10 ml de la muestra a cada uno de los 5 tubos que contienen 20 ml de caldo lauril concentración 1.5 y 1 ml y 0.1 ml a cada uno de los tubos de las series de 10 ml de caldo lauril concentración sencilla. Incubar los tubos a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, examinar los tubos a las 24 hrs y observar si hay formación de gas, en caso de no observarse la presencia de gas, incubar 24 hrs más.

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 verde brillante.
- Incubar los tubos a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 hrs y observar la formación de gas, en caso de no observarse la presencia de gas, incubar durante 24 hrs más.

Cálculo e 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 la tabla correspondiente, tabla 2 y tabla 3, e informar "número más probable de organismos coliformes por 100 ml" (NMP/100 ml).
- En caso de no observarse formación de gas después de 48 hrs de incubación de los caldos de las pruebas presuntivas y confirmativas, reportar como no detectable NMP/100 ml para agua potable, para agua purificada y hielos reportar como -1.1 NMP/100 ml, para aguas naturales, -1.8 NMP/100 ml, tomando en cuenta la dilución y multiplicar por la inversa de la dilución realizada.

Medidas de seguridad

Utilizar la bata del laboratorio, en caso de ingestión accidental de algún líquido, o quemaduras, proceder de acuerdo al procedimiento de bioseguridad del laboratorio, y notificar al jefe del mismo.

Capítulo 4

Determinación de coliformes fecales por la técnica del número más probable (presuntiva *Escherichia coli*)

Objetivo.

Establecer el método para la determinación de organismos coliformes fecales y *Escherichia coli* en muestras de agua y alimentos.

Establecer la técnica adecuada para la determinación dependiendo de la naturaleza de la muestra.

Campo de aplicación

Este método se aplicará a muestras de agua y alimentos en la que se requiera determinar y cuantificar la presencia de organismos coliformes fecales y *E. coli*

Referencias.

NOM-112-1994, Bienes y Servicios. Determinación de Bacterias Coliformes. Técnica del número más probable.

Métodos Normalizados. APHA 1992

Manual de Laboratorio de Microbiología Sanitaria, Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología, segunda edición. 2003

NOM-145-SSA1-1995. Productos cárnicos troceados y curados. Productos cárnicos curados y madurados. Especificaciones sanitarias. Apéndice normativo B.

Fundamento.

El método para determinar la presencia de organismos coliformes se basa en la capacidad de estos microorganismos para fermentar la lactosa con producción de gas, cuando los caldos provenientes de la prueba presuntiva son inoculados en medios de confirmación e incubados durante un periodo de 24 a 48 hrs a una temperatura de $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$

Materiales y Equipo

Tubos de ensaye de 16 x 150 mm y de 22 x 200 mm con tapón de rosca
Pipetas bacteriológicas de 1, 2, 5, y 10 ml, graduadas con filtro de algodón estériles
Frascos de nalgene de 250 ml con tapa de rosca
Campanas de fermentación
Gradillas para tubos de ensaye
Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro
Marcadores permanentes.
Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 1^{\circ}\text{C}$
Baño de agua con circulación mecánica que mantenga la temperatura a $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$
Autoclave que alcance una temperatura mínima de $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$
Potenciómetro con escala mínima de 0.1 unidades de pH a 25°C
Mechero

Reactivos y medios de cultivo

Solución reguladora de fosfatos
Caldo lauril en concentraciones triple, 1.5 y sencilla
Caldo EC
Caldo EC-MUG
Los reactivos y medios utilizados deberán ser grado analítico.

Condiciones ambientales

Esta determinación se realizará bajo condiciones de esterilidad, mediante el uso del mechero, evitando las corrientes de aire en el área durante el proceso.

Procedimiento

Procedimiento para agua potable.

Prueba presuntiva

-Agitar la muestra, transferir volúmenes de 20 ml de la muestra a cada uno de los cinco tubos que contienen 10 ml de caldo lauril triple concentración

-Incubar los tubos de 35 ± 1 °C. Examinar a las 24 ± 2 horas y observar si hay formación de gas, en caso contrario prolongar la incubación hasta 48 ± 2 horas.

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 EC-MUG. Inocular a dos tubos con caldo EC-MUG una cepa de *Escherichia coli* como control positivo y una de *Enterobacter aerogenes* como control negativo.

-Incubar los tubos a 44.5 ± 0.2 °C durante 24 hrs y observar la formación de gas, en caso de no observarse la presencia de gas, incubar durante 24 hrs más.

Procedimiento para aguas naturales

Prueba presuntiva

-Agitar la muestra, transferir volúmenes de 10 ml de la muestra a cada uno de los 5 tubos que contienen 20 ml de caldo lauril concentración 1.5 y 1 ml y 0.1 ml a cada uno de los tubos de las series de 10 ml de caldo lauril concentración sencilla.

-Incubar los tubos a 35 ± 1 °C, examinar los tubos a las 24 hrs y observar si hay formación de gas, en caso de no observarse la presencia de gas, incubar 24 hrs más.

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 EC-MUG. Inocular a dos tubos con caldo EC-MUG una cepa de *Escherichia coli* como control positivo y una de *Enterobacter aerogenes* como control negativo.

-Incubar los tubos a 44.5 ± 0.2 °C durante 24 hrs y observar la formación de gas, en caso de no observarse la presencia de gas, incubar durante 24 hrs más.

Cálculo e 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 la tabla correspondiente, tabla

2 y tabla 3, e informar "número más probable de organismos coliformes fecales por 100 ml" (NMP/100 ml).

-En caso de no observarse formación de gas después de 48 hrs de incubación de los caldos de las pruebas presuntivas y confirmativas, reportar para aguas naturales, -1.8 NMP/100 ml, tomando en cuenta la dilución y multiplicar por la inversa de la dilución realizada, para aguas potables reportar como -1.1 NMP/100 ml .

Prueba confirmativa de *Escherichia coli* (Método EC-MUG)

-Realizar la prueba presuntiva para agua potable y aguas naturales, tal como se indica en los puntos anteriores respectivamente.

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 EC-MUG. Inocular a dos tubos con caldo EC-MUG una cepa de *Escherichia coli* como control positivo y una de *Klebsiella pneumoniae* como control negativo.

-Incubar los tubos para la prueba confirmativa, los controles y uno adicional de caldo EC-MUG como blanco en baño de agua a $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ durante 24 hrs y observar la formación de gas, en caso de no observarse la presencia de gas, incubar durante 24 horas más.

Cálculo e interpretación de resultados

-Tomar la serie de tubos de la prueba confirmativa que dé formación de gas después del periodo de incubación requerido e irradiar los tubos con una fuente de luz UV, observar la fluoscencia y hacer la lectura correspondiente, buscar el NMP en la tabla correspondiente, tabla 2 y tabla 3 y calcular la presencia de *Escherichia coli* y reportar como NMP/100 ml.

-En caso de no observarse formación de gas después de 48 hrs de incubación de los caldos de las pruebas confirmativas, reportar para aguas naturales, -1.8 NMP/100ml, tomando en cuenta la dilución y multiplicar por la inversa de la dilución, para aguas potables reportar como -1.1 NMP/100 ml .

Procedimiento para alimentos

Prueba presuntiva

-Acondicionar la muestra y preparar diluciones decimales (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}); Inocular 1 ml de muestra a cada uno de los tres tubos que contienen 10 ml de caldo lauril sulfato triptosa.

3 tubos con 1 ml de muestra de la dilución 10^{-1}

3 tubos con 1 ml de muestra de la dilución 10^{-2}

3 tubos con 1 ml de muestra de la dilución 10^{-3}

-Incubar los tubos a $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$, examinar los tubos a las 24 hrs y observar si hay formación de gas, en caso de no observarse la presencia de gas, incubar 24 hrs más.

Prueba confirmativa

-De cada tubo que muestre formación de gas tomar una asada y sembrar en un número igual de tubos con el medio de confirmación, caldo EC. Incubar los tubos en baño de agua a $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ durante 24 hrs y observar la formación de gas, en caso de no observarse la presencia de gas, incubar durante 24 hrs más.

Cálculo e interpretación de resultados

-Reportar e informar "numero mas probable de organismos coliformes fecales por gramo o ml de alimento" NMP/ gr o ml. En caso de no observarse formación de gas después de 48 horas de incubación en los caldos de las pruebas presuntivas y confirmativas, informar como -3.0 NMP/ gr o ml ver tabla 4.

Medidas de seguridad

Utilizar la bata del laboratorio, en caso de ingestión accidental de algún líquido, o quemaduras, proceder de acuerdo al procedimiento de bioseguridad del laboratorio, y notificar al jefe del mismo.

Tabla 2. Índice del NMP para varias combinaciones de resultados positivos y negativos, cuando se usan 5 tubos con 20 ml de muestra de agua.

No de tubos positivos	NMP/100 ml	95 % de límite de confianza	
		Inferior	superior
0	-1.1	0	3.0
1	1.1	0.05	6.3
2	2.6	0.3	9.6
3	4.6	0.8	14.7
4	8.0	1.7	26.4
5	+8.0	4.0	Infinito

Tabla 3. Índice del NMP para 100 ml de muestra cuando se usan 5 porciones en cada una de las 3 diluciones con series geométricas, (10 ml, 1 ml, 0.1 ml)

Tubos positivos	NMP	Tubos positivos	NMP	Tubos positivos	NMP	Tubos positivos	NMP	Tubos positivos	NMP	Tubos positivos	NMP
0 0 0	-1.8	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	5 5 5	+1600

Tabla 4. NMP/ gr o ml de coliformes fecales para alimentos

Tubos positivos	NMP	Tubos positivos	NMP	Tubos positivos	NMP	Tubos positivos	NMP
0 0 0	-3.0	1 0 0	3.6	2 0 0	9.1	3 0 0	23.0
0 0 1	3.6	1 0 1	7.2	2 0 1	14.0	3 0 1	39.0
0 0 2	6.0	1 0 2	11.0	2 0 2	20.	3 0 2	64.0
0 0 3	9.0	1 0 3	15.0	2 0 3	26.0	3 0 3	95.0
0 1 0	3.0	1 1 0	7.0	2 1 0	15.0	3 1 0	43.0
0 1 1	6.1	1 1 1	11.0	2 1 1	20.0	3 1 1	73.0
0 1 2	9.2	1 1 2	15.0	2 1 2	27.0	3 1 2	120.0
0 1 3	12.0	1 1 3	19.0	2 1 3	34.0	3 1 3	160.0
0 2 0	6.2	1 2 0	11.0	2 2 0	21.0	3 2 0	93.0
0 2 1	9.3	1 2 1	15.0	2 2 1	28.0	3 2 1	150.0
0 2 2	12.0	1 2 2	20.0	2 2 2	35.0	3 2 2	210.0
0 2 3	16.0	1 2 3	24.0	2 2 3	42.0	3 2 3	290.0
0 3 0	9.4	1 3 0	16.0	2 3 0	29.0	3 3 0	240.0
0 3 1	13.0	1 3 1	20.0	2 3 1	36.0	3 3 1	460.0
0 3 2	16.0	1 3 2	24.0	2 3 2	44.0	3 3 2	1100
0 3 3	19.0	1 3 3	29.0	2 3 3	53.0	3 3 3	+1100

Capítulo 5

Determinación del genero *Salmonella* en alimentos

Objetivo

Establecer el método para el aislamiento e identificación del genero *Salmonella* en muestras de alimentos.

Campo de Aplicación

Esta determinación se realizara a aquellas muestra de alimentos que debido a su composición o manipulación facilitan la contaminación y proliferación del genero.

Referencias

Ecología microbiana de los alimentos. International on microbiological specifications for foods. Vol. II, 1980. Ed. Acribia, España.

NOM-114-SSA1-1994 de bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos

Manual de técnicas y procedimientos para análisis microbiológicos de productos carnicos. LNSP 1989.

Manual de técnicas y procedimientos para análisis microbiológicos de derivados lácteos. LNSP 1989.

Manual de técnicas y procedimientos para el estudio de microorganismos enteropatógenos. IEST 1987.

Diagnostico del laboratorio de infecciones Gastrointestinales. INDRE 1994.

Fundamentos

Por las condiciones desfavorables en las que se encuentran las bacterias pertenecientes a este género en los alimentos, se procede al uso de medios de preenriquecimiento y enriquecimiento para lograr un incremento en el número de organismos viables y reducir la competencia de la flora asociada, favoreciendo la recuperación del genero. La *Salmonella* es el genero de microorganismos mas

extensamente estudiado entre los patógenos que pueden ser aislados de los alimentos, aunque no es posible recomendar exclusivamente un medio de cultivo para el aislamiento de este tipo de microorganismos.

Materiales y Equipo

Matraz erlenmeyer de 500 ml.

Recipientes de boca ancha de 1 lt, con tapa de rosca.

Utensilios estériles (cuchillo, pinzas y cucharas).

Tubos de 16 x 150 mm y de 13 x 100 con tapón de rosca.

Pipetas bacteriológicas de 5 y 1 ml, graduadas en 0.1 ml, estériles con filtro de algodón.

Cajas petri estériles de vidrio o desechables.

Gradillas para tubo de ensaye.

Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro.

Papel pH (intervalos de 6-8) con graduaciones máximas de 0.4 unidades de pH para cambios de color.

Autoclave con termómetro y manómetro.

Incubadora con variación de temperatura ± 0.1 °C.

Baño de agua con termómetro.

Balanza electrónica con sensibilidad de 0.1 gr.

Licuada de una o dos velocidades controladas por un reóstato con vasos estériles.

Mechero Bunsen o Fisher.

Potenciómetro con una escala mínima de 0.1 unidades de pH a 25 °C.

Reactivos y medios de cultivo

Medios de preenriquecimiento

Agua peptonada tamponada

Caldo lactosado

Medios de enriquecimiento

Caldo Vassiliadis-Rappaport

Caldo tetraticnato.

Medios de aislamiento.

Agar Entérico Hektoen (HK).

Agar Xilosa Lisma Desoxicolato (XLD).

Agar para *Salmonella* y *Shigella* (SS).

Agar Sulfito de Bismuto (SB)

Medios para pruebas bioquímicas.

Agar de tres azúcares y hierro (TSI).

Agar de hierro y lisina (LIA).

Medio para Movilidad-indol-ornitina (MIO).

Agar base o nutritivo.

Agua peptonada.

Caldo urea

Agar Citrato de Simmons

Caldo Manitol

Soluciones.

Solución verdes brillante al 0.1%.

Solución de yodo-yoduro.

Solución salina 0.85%.

Solución salina formalizada.

Reactivo de Kovac.

Los reactivos y medios utilizados deberán ser de grado analítico y para su preparación consultar los métodos para la preparación de medios de cultivo y reactivos.

Condiciones ambientales

Esta determinación se realizara bajo condiciones de esterilidad, mediante el uso del mechero; evitar las corrientes de aire durante el procedimiento.

Descripción de la actividad

Preenriquecimiento

-Pesar asépticamente 25 gramos de muestra a un vaso estéril de licuadora o bolsa estéril para trabajar el homogeneizador peristáltico. Adicionar 225 ml del medio de

preenriquecimiento estéril y licuar si es necesario por un minuto. Transferir asépticamente la mezcla a un frasco de cultivo estéril y dejar reposar durante 60 minutos a temperatura ambiente con la tapa bien enroscada. Después del tiempo de reposo, mezclar bien y medir el pH. Ajustar si es necesario a un pH 6.8 ± 0.2 con una solución estéril de hidróxido de sodio 1N o ácido clorhídrico 1N. Incubar $24 \pm$ horas, a una temperatura de 35 ± 1 °C.

Enriquecimiento

-Agitar suavemente los frascos de preenriquecimiento y transferir 0.1 ml del cultivo anterior a un tubo que contenga 10 ml de caldo Vassiliadis-Rappaport y 1 ml a otro que contenga 10 ml de caldo tetracionano, al cual se le agrega momentos antes de su uso 0.2 ml de yodo-yoduro y 0.1 ml de solución de verde brillante, homogenizar.

-Incubar de 18 a 24 horas a una temperatura de 35 ± 1 °C. Para alimentos fuertemente contaminados incubar a 42°C por el mismo tiempo. Incubar el caldo Vassiliadis-Rappaport a 43 °C

Aislamiento

-Agitar los tubos de cultivo de enriquecimiento y por medio de un asa bacteriológica, estriar sobre la superficie de cuando menos 2 cajas de medios diferenciales selectivos, que puede ser: agar SS, agar SB, agar XLD, y agar HK. para cada uno de los tubos de enriquecimiento.

-Incubar a una temperatura de 35 ± 1 °C por 24 horas.

-Observar los cultivos para identificar colonias sospechosas de *Salmonella*, tomando en cuenta sus características morfológicas en cada uno de los medios selectivos utilizados.

- Agar HK: Desarrollo de colonias verdes a azul verdes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.

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

- Agar SB: Desarrollo de colonias de color café, grises o negras, con o sin brillo metálico, generalmente el medio circulante (halo) es café, tornándose posteriormente negros.
- Agar SS: Desarrolló de colonias translúcidas opacas, algunas colonias presentan centro negro. Las colonias fermentadoras de la lactosa son rojas.

Identificación de reacciones bioquímicas

- Seleccionar al menos 2 colonias típicas, sospechosas que se encuentren bien aisladas de cada medio selectivo utilizado.
- Transferir con un asa cada colonia seleccionada a una serie de tubos de cultivo, para su identificación bioquímica. Inoculando estos en el siguiente orden, primero los medios líquidos, los semisólidos y por último los sólidos.

Las reacción característica del genero **Salmonella** en los medios de cultivo utilizados para su identificación bioquímica son:

- Agar TSI.- Este medio se inocula con doble picadura en el fondo y por estría en la superficie. Contiene 3 azúcares, lactosa, sacarosa y glucosa, un indicador para detectar su fermentación, una sal de hierro para detectar producción de H₂S. La reacción característica en este medio para el genero **Salmonella** es K/A, en la mayoría de los casos con producción de ácido sulfhídrico, y con la presencia o no de gas.
- Agar LIA .- Este medio se inocula por picadura en el fondo y estría en al superficie. Contiene lisina que al ser descarboxilada produce una amina que eleva el pH, que se detecta por medio de un indicador, originado la intensificación del color púrpura en el tubo. Considerar negativos aquellos que presenten un vire de color amarillo. La reacción es este medio para el genero **Salmonella** es una reacción de descarboxilacion de la lisina o K/K, con intensificación del color púrpura, con presencia o no de ácido sulfhídrico.
- Medio MIO.- Medio semisólido se inocula por picadura en el fondo. Sirve para determinar movilidad, producción de indol y descarboxilacion de la ornitina. La reacción en este medio para el genero **Salmonella** es movilidad positiva, indol negativo, y ornitina positivo.

- Caldo urea .- Ureasa convencional, con un asa estéril, tomar crecimiento del cultivo presumiblemente positivo a Salmonella, inocular un tubo con caldo urea. Utilizar un control del medio para comparar el vire púrpura de las reacciones positivas con el color original del medio.
- Agua peptonada.- Medio líquido, se utiliza para confirmar la producción de indol, se inocula por suspensión. La reacción para el género **Salmonella** es indol negativo, al agregar el reactivo de Kovac
- Agar base (BAB).- Medio simple, no selectivo. Que se inocula por picadura en el fondo y estrías en la superficie, se utiliza para conservar las cepas obtenidas, y contar con un cultivo desarrollado en un medio sin azúcares para realizar las pruebas de

Identificación serológica

- Colocar con una asa dos gotas de solución salina formalizada estéril sobre un porta objetos o en dos secciones de una placa para aglutinación. Suspender en cada una de las gotas, una porción del cultivo desarrollado en BAB.
- Observar la suspensión si no presenta autoglutinación, en caso de no observarse, agregar a una de ellas una gota del antisuero polivalente somático (0) y mezclar con el asa, o un aplicador de madera.
- Agitar inclinando la lámina hacia delante durante un minuto aproximadamente, observar bajo una buena iluminación sobre un fondo oscuro. Considerar cualquier grado de aglutinación como positiva en la gota que contenga el antisuero, considerar como testigo negativo de no aglutinación la gota de la suspensión que contiene únicamente el cultivo y la solución salina formalizada.
- Cuando la aglutinación es positiva con el polivalente 0, determinar el subgrupo empleando antisueros para los diferentes subgrupos (B, C, D, y E, suelen ser los más frecuentes).
- Si la aglutinación con el suero 0 es negativa, utilizar antisuero Vi y efectuar nuevamente la prueba. Si hay aglutinación, hacer una suspensión del cultivo con solución salina y calentar a ebullición en baño maría durante 15 minutos, y repetir la seroaglutinación con el polivalente 0. En caso de no observar aglutinación con el antisuero Vi descartar.

Cálculos

Interpretación de reacciones bioquímicas y serológicas. Ver tabla 5 y 6

Interpretación e informe de resultados

En caso de obtener secuencia bioquímica compatible al género **Salmonella** y la seroaglutinación positiva con el polivalente o reportar como:

- Presencia de **Salmonella** en 25 g o ml de muestra.

En caso negativo reportar como:

- Ausencia de **Salmonella** en 25 g o ml de muestra.

Medidas de seguridad

Utilizar bata del laboratorio, en caso de ingestión accidental de algún líquido, o quemadura proceder de acuerdo al procedimiento de bioseguridad del laboratorio y notificar al jefe del laboratorio.

Medias de control de calidad

cada dos semanas realizar con cepas testigos positivos **Salmonella** un control de la técnica, que nos permitirá también evaluar la capacidad de los analistas para su recuperación de los controles.

Probar la reactividad del polivalente (antisuero) cada vez que se abra un frasco, utilizando para tal fin una cepa de **Salmonella** como control positivo y una cepa de **E. coli** como control negativo.

Tabla 5. Interpretación de resultados de las reacciones bioquímicas y serológicas para Salmonella.

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

Tabla 6. Reacciones bioquímicas y serológicas del género Salmonella

Prueba o Sustrato	Positivo	Negativo	Reacción
Glucosa (TSI)	Amarillo	Rojo	+
Lactosa (TSI)	Amarillo	Rojo	-
H ₂ S (TSI Y LIA)	Negro	No Negro	+
Lisina descarboxilasa	Púrpura	Amarillo	+
Movilidad	C/ crecimiento	S/ crecimiento	+
Prueba de indol	Violeta	Amarillo	-
Ornitina descarboxilasa	Púrpura	Amarillo	+
Caldo urea	Rosa púrpura	Rosa bajo	-
Prueba del antígeno	Aglutinación	No aglutinación	+

Capítulo 6

Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos

Objetivo

Establecer el método para el aislamiento y cuantificación de *S. aureus* en alimentos

Campo de aplicación

Este método se aplicara a productos lácteos y derivados, carnes frías, mariscos crudos o cocidos y a postres o dulces de leche y derivados.

Referencias

Ecología microbiana de los Alimentos. International commssión on microbiological specifications for foods. Vol. II, 1980, Edt. Acribia, España.

NOM-115-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para determinar de *Staphylococcus Aureus* en alimentos.

Manual de técnicas y procedimientos para análisis microbiológicos de productos carnicos. LNSP 1989.

Manual de técnicas y procedimientos para análisis microbiológicos de derivados lácteos. LNSP 1989.

Manual de técnicas y procedimientos para el estudio de microorganismos enteropatógenos. IEST.1987

Diagnostico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. INDRE. 1994

Fundamento

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 espera mas de 100 células de *Staphylococcus aureus* por gramo.

Materiales y Equipo

Cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas y separador de yemas estériles
Tubos de ensaye de 16 mm x 150 mm
Frascos de 125 a 250 ml de capacidad
Tubos de ensaye de 13 mm x 100 mm
Cajas petri desechables estériles
Pipetas bacteriológicas de 1 ml y 10 ml de capacidad graduadas en 0.1 ml y 1 ml respectivamente
Pipetas Pasteur
Probeta
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
Autoclave con termómetro y manómetro
Baño de agua con regulador de temperatura de 35 ± 0.5 °C
Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reostato
Balanza electrónica con sensibilidad de 0.1 g
Incubadora a 35 ± 1 °C
Mechero Bunsen o Fisher

Reactivos y medios de cultivo

Solución reguladora de fosfatos
Medio de Baird-Parker
Caldo de infusión cerebro-corazón (BHI)
Ácido desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera
Plasma de conejo
Los reactivos y medios utilizados deberán ser de grado analítico

Condiciones ambientales

Esta determinación se realizara bajo condiciones de esterilidad, mediante el uso del mechero; evitar corrientes de aire durante en procedimiento.

Descripción de la actividad

Método de Baird-Parker

- Acondicionar la muestra y preparar hasta la dilución deseada de acuerdo a lo establecido en el la NOM 110 (preparación y dilución de muestras).
- Colocar 0.1 ml de cada dilución sobre placas de agar Baird-Parker y extender con una varilla "L" de vidrio en toda la superficie del medio. Usar varilla para cada dilución.
- Mantener las placas en su posición hasta que el inóculo sea absorbido por el agar, e Invertir las placas e incubar de 45 a 48 horas a 35 °C.
- Seleccionar las placas de las diluciones que contengan entre 15 – 150 colonias típicas de *Staphylococcus aureus*, si no es posible, seleccionar las placas de las diluciones más altas no obstante tengas mas de 150 colonias.
- Cuando las placas tengan menos de 15 colonias típicas, también puede ser utilizadas y el informe se debe agregar la nota de "valor estimado".
- Las colonias típicas son negras, circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1 a 2 mm y muestra una zona opaca y un halo alrededor de la colonia.
- Seleccionar las colonias de acuerdo a la tabla 7 para realizar las pruebas de cuagulasa y termonucleasa.

Tabla 7. Calculo de colonias de Estafilococo para probar

Números de colonias sospechosas en placa	Número de colonias a probar
Menos de 50	3
51 a 100	5
101 a150 o más	7

- Seleccionar el numero de colonias y sembrar cada una en tubos con 0.5 ml de caldo infusión cerebro-corazón.
- Incubar los tubos inoculados a 35 °C durante 24 horas.
- Inocular en la misma forma cepas conocidas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* como testigos positivos y negativos.

-Después del periodo de incubación pasar con una pipeta de 1 ml, 0.3 ml de cada cultivo a otro tubo de 13 x 100 mm y conservarlo para la prueba de termonucleasa. El resto del cultivo se usa para la prueba de coagulasa.

Prueba de coagulasa

-Agregar a los 0.2 ml del cultivo anterior 0.2 ml de plasma de conejo diluido volumen a volumen con solución salina estéril.

-Incubar en baño de agua de 35 a 37 °C y observar durante 6 horas a intervalos de 1 hora, si no hay formación de coagulo incubar y observar a las 24 horas. Considerar la prueba positiva si hay formación del coagulo en los tubos.

-Para comprobar la coagulabilidad del plasma de conejo se añade una gota de cloruro de calcio al 5% a 0.5 ml del plasma reconstituido empleado, formándose un coagulo en un tiempo de 10 a 15 segundo.

Prueba de termonucleasa

-Calentar durante 15 minutos 0.3 ml de cultivo en caldo de infusión cerebro-corazón en baño de agua hirviendo.

-Pasar una gota de cada cultivo por medio de una pipeta Pasteur a un orificio del medio, incluyendo los testigos.

-Incubar a 35 °C en cámara húmeda por un periodo de 4 a 24 horas.

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

Cálculos

-Hacer el cálculo del contenido de microorganismos en el producto tomando en cuenta en número de colonias totales, el número de colonias confirmadas, la dilución y el volumen inoculado.

Núm. de col. de *S. aureus* = $\frac{(\text{número total de col.}) (\text{número de col. confirmadas})}{\text{num. de colonias probadas}}$

Coagula positivo

num. de colonias probadas

-Redondear la cifra a dos signos significativos y multiplicar en número de colonias por la inversa de la dilución utilizada.

Interpretación e informe de resultados

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

Medidas de seguridad

Utilizar bata del laboratorio, en caso de ingestión accidental de algún líquido, o quemadura proceder de acuerdo al procedimiento de bioseguridad del laboratorio y notificar al jefe del laboratorio.

Medidas de control de calidad

Utilizar cepas testigos positivos y negativos durante la ejecución de la técnica, que nos permita también evaluar la capacidad de los analistas para su recuperación de los controles. Comprobar periódicamente la coagulabilidad del plasma utilizado.

Capítulo 7

Aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* en alimentos y agua blanca

Objetivo

Establecer el método para aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* en muestra de alimentos y aguas blancas.

Campo de aplicación

Este procedimiento se aplicará a muestras de alimentos, principalmente pescados y mariscos, hortalizas, así como a muestras de aguas blancas recepcionadas en el laboratorio.

Referencias

NOM-031-SSA1-1993. Bienes y servicios. Productos de pesca, moluscos bivalvos frescos, refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias.

Manual de técnicas y procedimientos para la investigación de *Vibrio cholerae* en aguas y alimentos. Laboratorio Nacional de Salud Pública. México 1992.

Manual de procedimientos para aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* 01 Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica. México 1991.

Fundamento

Se basa en la capacidad de *Vibrio cholerae* de crecer en medios nutritivos con sal y sin sal, así como su tolerancia a altas temperaturas de incubación.

Materiales y Equipo

Balanza granadina de 2000 g de capacidad y 0.2 g de sensibilidad.

Incubadora de 39-40 °C.

Baño de agua de 42 ± 0.2 °C y 35 a 37 °C.

Potenciómetro

Licuada y vasos de licuadoras estériles.

Frascos de vidrio o plástico de boca ancha de 1000 ml de capacidad con tapa de rosca.

Cucharas, cuchillos y otros utensilios estériles.

Caja de petri estériles desechables.

Pipetas estériles de 1, 2, 5, y 10 ml. Con graduación

Asas bacteriológicas de 3 mm de diámetro de nicromel o platino.

Tubos de ensaye de 16 x 150 mm, 20 x 150 mm y 13 x 100 mm.

Mechero

Papel pH (rango 1-14)

Bolsas de polietileno con tapa resellable.

Reactivos y medios de cultivo

Agua peptonada alcalina pH 8.5

Agar TCBS (agar tiosulfato citrato, sales biliares y sacarosa)

Agar T1N1 (agar triptona y sal)

Caldo triptona (T1 No.)

Tiras reactivas para pruebas de oxidasa.

Agar de tres azucares y hierro (TSI).

Agar de hierro y lisina (LIA).

Medio para Movilidad-indol-ornitina (MIO).

Agar base o nutritivo

Agua peptonada.

Solución salina al 0.85%.

Solución salina formalizada

Reactivo de Kovac.

Los reactivos y medios utilizados deberán ser de grado analítico

Condiciones ambientales

Esta determinación se realizará bajo condiciones de esterilidad, mediante el uso del mechero; evitar las corrientes de aire durante el procedimiento.

Procedimiento en muestras de alimentos.

Enriquecimiento.

-Pesar 25 gr. del alimento y licuar con 225 ml de agua peptonada alcalina durante dos minutos para lograr la homogenización (dilución 1:10). Dividir en dos frascos y preparar diluciones 1:100 y 1:1000 con agua peptonada. En este momento se deberá tener dos series de tres diluciones.

-Incubar una serie a 35-37 °C y la otra a 42 °C por un periodo de tiempo de 6 a 8 horas, y reincubar por un periodo de 18 a 24 horas.

Aislamiento

-Después del periodo de incubación (6 horas y 18 horas respectivamente), sin agitar los frascos y tubos, tomar un inóculo de la parte superficial del medio, donde generalmente se observa la formación de una película de crecimiento superficial, con un asa de 3-5 mm de diámetro y sembrar por estría en cajas petri con agar TCBS, señalando en caja clave y número de muestra, dilución, temperatura y tiempo de incubación.

-Incubar las placas de TCBS a 35-37 °C por un tiempo de 18 a 24 horas.

-Después del tiempo de incubación examinar las cajas a fin de determinar la presencia de colonias características a *Vibrio* que generalmente se observan de color amarillo, lisas y achatadas de tamaño grande a medianas, con el centro opaco y los bordes translucidos.

Selección

-Seleccionar por lo menos tres colonias características de cada dilución sembrada en TCBS y sembrar cada colonia por suspensión en tubos con caldo T1N0 por estría en agar T1N1, e incubar a 35-37 °C por un periodo de 18 a 24 horas.

-Leer los resultados de la siembra en T1N0 y T1N1, la prueba se considera positiva y se seleccionan las diluciones correspondientes, si el tubo del caldo T1N0 se enturbia y en el agar T1N1 existe crecimiento de colonias.

-Seleccionar al menos dos colonias sospechosas que se encuentren bien aisladas en el agar T1N1, y realizar la prueba de oxidasa, utilizando placas o tiras comerciales para esta reacción. Las especies de *Vibrio* son oxidasa positivo.

Identificación bioquímica

-Transferir con un asa cada colonia seleccionada del medio T1N1 a una serie de 6 tubos de cultivo para su identificación bioquímica. Inoculando esto en el siguiente orden, primero los medio líquidos, los semisólidos y por ultimo los sólidos.

La reacción característica del genero *Vibrio* en los medios diferenciales son:

-Agar TSI.-Este medio se inocula con doble picadura en el fondo y por estrías en la superficie. Contiene 3 azucres, lactosa, sacarosa y glucosa, un indicador para detectar la fermentación, una sal de hierro para detectar producción de H₂S.

La reacción característica en este medio para el genero *Vibrio* es en el fondo del tubo un color amarillo (pH ácido, fermentación de glucosa), en la superficie del tubo una coloración roja o amarilla por la fermentación o no de lactosa o sacarosa, sin producción de ácido sulfúrico y gas.

-Agar LIA .- Este medio se inocula por picadura en el fondo y estría en la superficie. contiene lisina que al ser descarboxilada produce una amina que eleva el pH, que se detecta por medio de una indicador, originando la intensificación del color púrpura en el tubo. Considerar negativos aquellos que representen un vire de dolor amarillo.

La reacción es este medio para el género *Vibrio* es una reacción de descarboxilacion de la lisina o K/K, con intensificación del color púrpura, sin la presencia de ácido sulfhídrico.

-Medio MIO.- Medio semisólido se inocula por picadura en el fondo. Sirve para determinar movilidad, producción de indol y descarboxilacion de la ornitina. La reacción en este medio para el genero *Vibrio* es movilidad, indol positivo y ornitina positivo.

-Agua peptonada.- Medio liquido, se utiliza para confirmar la producción de indol, se inocula por suspensión, al agregarle reactivo de Kovac. La reacción para el genero *Vibrio* es indol Positivo.

-Caldo Arginina.- Este medio sirve para demostrar la descarboxilacion de la arginina, se inocula por suspensión. Este medio debe sellarse después de su inoculación con vaselina liquida, para *Vibrio Cholerae* es negativo observándose por el vire del medio un color amarillo.

-Agar base (BAB).- Medio simple, no selectivo, que se inocula por picadura en el fondo y estría en la superficie, se utiliza para conservar las cepas obtenidas, y contar con un cultivo desarrollado en un medio sin azúcares para las pruebas de seroaglutinación.

Identificación serológica

-Seleccionar las secuencias bioquímicas compatibles a *Vibrio cholerae* y realizar la seroaglutinación.

-Colocar con una asa dos gotas de solución salina formalizada estéril sobre un portaobjeto en dos secciones de una placa para aglutinación. Suspender en cada una de las gotas, una porción del cultivo desarrollado en BAB.

-Observar la suspensión si no presenta autoaglutinación agregar a una de ellas una gota del polivalente (O1) y mezclar con el asa, o un aplicador de madera.

Agitar inclinando la lámina hacia atrás y hacia delante durante un minuto aproximadamente, observar bajo una buena iluminación sobre un fondo oscuro.

Considerar cualquier grado de aglutinación como positivas en la gota que contenga el antisuero, considerar como testigo negativo de no aglutinación la gota de la suspensión que contiene únicamente el cultivo y la solución salina formalizada.

Procedimiento en muestras de aguas blancas

-Las muestras de aguas blancas, deben ser tomadas en ciertos puntos fijos tales como estaciones de bombeo, tanques de almacenamiento y puntos de la red distribución de agua potable, así como de ríos, lagunas, pozos, etc. La toma de la muestra se realiza la filtración del agua a través de un hisopo de espira.

Enriquecimiento

-El hisopo de espira se sumerge en 450 ml de agua peptonada alcalina estéril en recipientes de plástico de boca ancha y se incuban a una temperatura de 35-37 °C por un tiempo de 18 a 24 horas. En el caso de que se recolecte únicamente la muestra de agua, tomar 450 ml de esta y agregarle 50 ml de agua peptonada alcalina concentrada e incubarla de la forma antes mencionada.

-Después del tiempo de incubación, retirar los frascos de la incubadora, evitando su agitación y tomar con un hisopo estéril la película formada en la superficie y transferirla a un tubo que contenga 10 ml de agua peptonada e incubar a 35-37 °C durante un tiempo de 6 a 8 horas.

Aislamiento

-Transcurrido el tiempo de incubación tomar con un asa la película formada en la superficie formada en la superficie del medio y sembrar por estría en cajas petri en que contengan agar TCBS. Incubar a 35-37 durante un periodo de tiempo de 18 a 24 horas. Examinar las placas a fin de determinar la presencia de colonias sospechosas de *Vibrio cholerae*, de acuerdo a las características antes mencionadas.

Identificación bioquímica

-Seleccionar al menos dos colonias típicas, sospechosas que se encuentren bien aisladas del medio selectivo utilizado y sembrar en medios para determinar su secuencia bioquímica de la forma antes mencionada. Probar serología.

Interpretación de reacciones bioquímicas e informe de resultados, ver tabla 8

En caso de obtener secuencia bioquímica compatible a *Vibrio cholerae* y la seroaglutación con el polivalente O1 positivo reportar como:

Presencia o ausencia de *Vibrio cholerae* O1 en 25 g o ml de muestra.

En aguas blancas reportar:

Presencia o ausencia de *Vibrio cholerae* O1.

Medidas de seguridad

Utilizar bata del laboratorio, en caso de ingestión accidental de algún líquido, o quemadura proceder de acuerdo al procedimiento de bioseguridad del laboratorio y notificar al jefe del laboratorio.

Medidas de control de calidad

Cada dos semanas realizar con cepas testigos positivos a *Vibrio cholerae* 01 un control de la técnica, que nos permitirá evaluar la capacidad de los analistas para su recuperación del control.

Tabla 8. Reacciones bioquímicas y serológicas de *Vibro cholerae* 01

Prueba de Sustrato	Positivo	Negativo	Reacción
Glucosa (TSI)	Amarillo	Rojo	+
Sacarosa	Amarillo	Rojo	-
Lactosa (TSI)	Amarillo	Rojo	-/+
H ₂ S (TSI y LIA)	Negro	No Negro	-
Lisina descarboxilasa	Púrpura	Amarillo	+
Movilidad	Con crecimiento	Sin crecimiento	+
Prueba de indol	Violeta	Amarillo	+
Ornitina descarboxilasa	Púrpura	Amarillo	+
Arginina	Púrpura	Amarillo	-
Polivalente 01	Aglutinación	No aglutinación	+

Capítulo 8

Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

El aislamiento, identificación y recuento de los diferentes microorganismos a partir de los alimentos y del agua, es de necesidad cotidiana y de un significado decisivo en el diagnóstico, la prevención y el control de las enfermedades gastrointestinales.

El cuadro clínico de un paciente, su respuesta al tratamiento. El curso que toma un brote de gastroenteritis, la proximidad y evidencias de operación de una fuente de contaminación, la ausencia de refrigeración de un alimento, etc., son desde luego importantes elementos que se tomarán en cuenta durante el estudio epidemiológico de un brote; pero la investigación completa, que presupone un diagnóstico concluyente solo se alcanza cuando se efectúan los análisis de laboratorio pertinentes tan exhaustivamente como las circunstancias lo demandan.

A falta de estos, el problema no podrá ser resuelto, las estadísticas se falsean, y las medidas que se tomen para el control del padecimiento se moverán en torno a meras especulaciones más o menos alejadas de la realidad. Descubrir y definir una fuente de contaminación, el mecanismo por el cual ha operado o continúa haciéndolo, las causas accesorias y desencadenantes que fácilmente conducen al estallido de un brote, demandan, se insiste, de servicios de laboratorio de salud pública con personal calificado y recursos materiales bastantes que ponen en acción los sistemas modernos de muestreo y análisis bacteriológico. La voluminosa literatura sobre la eficiencia de las técnicas evaluadas para estos fines, revela la variedad de factores que influyen en el aislamiento de microorganismos a partir de diferentes alimentos y otros materiales. En general, las técnicas son laboriosas, requieren tiempo y personal bien adiestrado. Los métodos que implican el cultivo de microorganismos se utilizan más ampliamente y tienen mayor especificidad que aquellos que hacen uso del examen microscópico; estos muestran menor especificidad, pero se completan en un período mucho más corto.

El aislamiento de los microorganismos a partir de los alimentos y otros sustratos, requieren de una metodología que difiere claramente de la utilizada es el estudio de humanos.

Dos son las razones fundamentales.

- a).- El germen suele encontrarse en números muy reducidos en el producto que se pretende investigar (ocasionalmente una o unas cuantas células en 25 a 500 gr.).
- b).- Es cosa común que tales células se encuentren dañadas en su capacidad metabólica por efecto de agentes diversos que han actuado en el material en el cual se encuentran (calor, frío, desecación, radiaciones, etc.), por lo que requieren de un tratamiento restaurador antes de ponerlas en contacto con las sustancias antibacterianas de los medios de enriquecimiento.

Recomendaciones

Promover y realizar las metodologías en el laboratorio, para que nos permitan evaluar y mantener un nivel de calidad sanitaria alimentaria satisfactoria, para reducir al mínimo los problemas gastrointestinales de la población expuesta.

Elevar la calidad sanitaria de los alimentos a través del análisis de las muestras.

Adoptar las medidas higienicodietéticas preventivas o correctivas necesarias para minimizar los efectos sobre la salud de la población consumidora de alimentos.

Todo esto a través del control sanitario de productos de consumo y poder satisfacer las necesidades de la población protegiéndola contra riesgos ocasionados por el uso o consumo de alimentos y bebidas contaminados a los de que manera voluntaria y a veces involuntaria se expone los consumidores.

El propósito del Laboratorio de análisis Microbiológico, debe consistir en controlar y asegurar la calidad sanitaria de sus resultados, entendiendo por calidad sanitaria las propiedades y características óptimas de un producto para satisfacer las necesidades específicas .

Cuando se descuida el desarrollo de un proceso analítico se propicia deficiencia en la obtención de los resultados, por lo que las presentes metodologías establecen los puntos críticos de control dentro de la vigilancia sanitaria, con el propósito de obtener resultados confiables.

Anexo 1

Preparación de medios de cultivo

Procedimiento

- Para la preparación de los medios de cultivo se deberá utilizar únicamente agua destilada o deionizada que tenga calidad aceptable.
- En el área de preparación se deberá usar material de vidrio, limpio y libre de agentes que pudieran afectar la integridad del medio, y equipos como balanzas, potenciómetro, olla de presión y autoclave, previamente validos y calibrados.
- Utilizar en el área un manual que indique la forma adecuada de preparación de cada uno de los medios de cultivo.

Preparación de Agares.

Agar de Bilis y Rojo Violeta

Medio selectivo para detección de Coliformes.

Fórmula aproximada en g/lit.

Extracto de levadura	3.0
Peptona de Gelatina	7.0
Lactosa	10.0
Mezcla de Sales Biliares	1.5
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0
Rojo Neutro	0.03
Cristal Violeta	0.002

Ajustar el pH final a 7.4 ± 0.2

Preparación:

Pesar 41.5 g del medio deshidratado aforar a 1 lit. con agua deionizada, mezclar ajustar el pH y calentar con agitación frecuente y hervir por 1 minuto hasta obtener una

homogeneización completa. Enfriar a 45 °C., y vaciar 200 ml. del medio en frasco de cristal. Esterilizar en autoclave a 121 °C. durante 15 minutos y posteriormente almacenar.

Agar de Eosina y Azul de Metileno

para el aislamiento y diferenciación de coliformes y otras enterobacterias de interés Médico y sanitario.

Fórmula aproximada de g/lt.

Peptona de gelatina	10.000
Lactosa	10.000
Fosfato dipotásico	2.000
Agar	15.000
Eosina	0.400
Azul de Metileno	0.065

PH final 7.2 ± 0.2

Preparación:

Pesar 36 gramos del medio y aforar a un litro con agua deionizada. Mezclar y dejar en reposo de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta obtener una homogeneización completa. Esterilizar a 121 °C. durante 15 minutos. Enfriar el medio hasta una temperatura aproximada a 45 °C. vaciar de 20 a 25 mililitros por caja petri estéril.

Agar de Hierro y Triple Azúcar (agar TSI)

Medio diferencial para la identificación de reacciones bioquímicas.

Fórmula aproximada en g/lt.

Mezcla de peptonas	20.0
Cloruro de sodio	5.0
Lactosa	10.0
Sacarosa	10.0
Dextrosa	1.0

Sulfato de Amonio Ferrico	0.2
Rojo Fenol	0.025
Agar	13.0
Tiosulfato de Sodio	0.2
Ajustar el pH hasta 7.3 ± 0.2	

Preparación:

Pesar 33 g. Del medio deshidratado y aforar a 1 lt. con agua deionizada. Agitar y calentar hasta obtener una homogeneización completa, verter 3.5 mililitros del medio en tubos de 13 x 100 mm. Con tapón de rosca. Esterilizar durante 15 minutos a 118 °C.

Inclinar para solidificar, de manera que se logre en fondo de 2 a 2.5 centímetros. Y un bisel de 3 a 3.5 centímetros.

Mantener almacenado en refrigeración de 2 a 8 °C. de temperatura.

Agar de hierro y Lisina

Medio diferencial para reacciones bioquímicas.

Fórmula aproximada en g/lt.

Peptona de gelatina	5.00
Extracto de Levadura	3.00
Dextrosa	1.00
L-Linasa	10.00
Citrato de Amonio Ferrico	0.50
Tiosulfato de Sodio	0.04
Púrpura de Bromocresol	0.02
Agar (deseado)	13.50

Para ajustar el pH 6.7 ± 0.2

Preparación:

Pesar 33 g. del medio deshidratado y aforar a 1 lt. con agua deionizada. Calentar hasta obtener una homogeneización completa, vaciar 3.5 ml. del agar en tubos de 13 x 100 con tapón de rosca y esterilizar a 121 °C. durante 12 minutos. Inclinar los tubos y

esperara su completa solidificación. Conservar el medio ya preparado en refrigeración de entre 2 a 8 °C. de temperatura.

Agar entérico Hektoen

Fórmula aproximada en g/lit.

Proteosa peptona	12.000
Extracto de Levadura	3.000
Lactosa	12.000
Sacarosa	10.000
Salicina	2.000
Sales biliares	9.000
Cloruro de sodio	5.000
Tiosulfato de sodio	5.000
Citrato amónico Ferrico	1.500
Azul de bromotimol	0.064
Fuscina ácida	0.100
Agar	13.500

PH final: 7.5 ± 0.2

Preparación:

Suspender 76 gr. en 1litro de agua deionizada con agitación y hervir hasta la completa disolución del agar, no esterilizar en autoclave. Dejar enfriar a 55 °C y distribuir en cajas de petri estériles en condiciones asépticas.

Agar sulfito de bismuto

Fórmula gr / lit

Extracto de carne de res	5.000
Mezcla de peptonas	10.000
Glucosa	5.000
Fosfato Disódico	5.000
Sulfato Disódico	0.300

Verde Brillante	0.025
Agar	20.000

pH final: 7.6 ± 0.2

Preparación:

Suspender 52 gr. del polvo en un litro de agua deionizada, ajustar el pH y calentar hasta completa disolución, agitado con frecuencia. 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 debe usarse el mismo día de su preparación, si la coloración es parda, no debe utilizarse.

Agar para Métodos Estándar

Para recuento en placa de bacterias en microbiología sanitaria.

Peptona de caseína	5.0
Extracto de lavadura	2.5
Dextrosa	1.0
Agar	15.0

Ajustar el pH hasta 7.0 ± 0.1

Preparación:

Pesar 23.5 gr. del medio deshidratado y aforar a 1 litro con agua deionizada. Mezclar de 5 a 10 minutos. Calentar y agitar hasta obtener una homogeneización completa, hervir durante 1 minuto. Distribuir en frascos con un volumen de 200 ml. en cada frasco, esterilizar en autoclave a 121 °C. durante 15 minutos. Almacenar

Agar para Salmonella y Shingella.

Aislamiento de enterobacterias patógenas.

Fórmula aproximada en g/lt.

Extracto de carne	5.0
Mezcla de peptonas	5.0
Lactosa	10.0

Mezcla de sales biliares	8.5
Citrato de sodio	8.5
Tiosulfato de sodio	8.5
Citrato Ferrico	1.0
Agar	13.00
Rojo neutro	0.025
Verde brillante	0.330

pH final del medio 7 ± 0.2

Preparación:

Pesar 60 gr. del medio deshidratado y aforar a 1 litro con agua deionizada. Agitar para obtener una suspensión homogénea y ajustar el pH. Calentar con agitación constante y hervir durante 1 minuto. No esterilizar en autoclave, deje enfriar hasta 45 °C. y vaciar de 20 a 25 ml. en cajas petri, almacenar en refrigeración a una temperatura de 2 a 8 °C.

Agar TCBS (Tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa)

Medio selectivo para Vibrio.

Fórmula aproximada g/lt.

Agar	14.00
Azul de bromotimol	0.04
Azul de timol	0.04
Bilis de buey	5.00
Citrato de hierro	10.00
Cloruro de sodio	10.00
Colato de sodio	3.00
Extracto de levadura	5.00
Polipeptona	10.00
Sacarosa	20.00
Tiosulfato de sodio	10.00

Ajustar el pH a 8.6 ± 0.2

Preparación:

Pesar 88 gr. del medio y aforar a 1 litro con agua deionizada. Calentar agitado obtener una homogeneización completa, hervir durante 1 minuto. No esterilizar en autoclave. Enfriar a 45 °C. y vaciar de 20 a 25 mililitros en cajas petri estériles.

Agar XLD (Xilosa-Lisina-Desoxicolato).

Para aislamiento de bacterias enteropatógenas.

Fórmula aproximada en g/lt.

Xilosa	3.50
L-Lisina	5.00
Lactosa	7.50
Sacarosa	7.50
Cloruro de sodio	5.00
Extracto de levadura	3.00
Rojo de fenol	0.08
Agar	13.50
Desoxicolato de sodio	2.50
Tiosulfato de sodio	6.80
Citrato de hierro y amonio	0.80

Ajustar el pH a 7.4 ± 0.2

Preparación:

Pesar 55 gr. del medio deshidratado y aforar a 1 lt. con deionizada, dejar hidratar, durante 5 a 10 minutos. Calentar y agitar hasta su completa homogeneización. No sobrecalentar. En caso de formación de precipitado agitar el matraz frecuentemente mientras es vaciado el medio en las cajas petri.

Base de agar Baird Parker. (Agar de lisina piruvato telurito).

Para el aislamiento e identificación de Estafilococos.

Fórmula aproximada en g/lt.

Peptona de caseína	10.0
--------------------	------

Extracto de carne	5.0
Extracto de levadura	1.0
Cloruro de litio	5.0
Agar	17.0
Glicina	12.0
Piruvato de sodio	10.0
Ajustar el pH a 6.8 ± 0.2	

Preparación:

Pesar 63 gr. del medio deshidratado en 950 ml de agua deionizada. Dejar hidratar de 5 a 10 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto. Distribuir 190 ml en frascos y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar a 45-50 °C y agregar 2 mililitros de solución telurito de potasio al 1% y 10 ml de emulsión de yema de huevo. Homogenizar suavemente y vaciar en cajas petri, quitando las burbujas del medio con el mechero.

Preparación de la emulsión de la yema del huevo

- Lavar los huevos con agua y detergente y desinfectarlos con solución de yodo-alcohol.
- Separar la yema de la clara con la ayuda de un separador de yema, realizar todo esto en condiciones de esterilidad.
- Colocar las yemas en una probeta hasta obtener un volumen de 60 mililitros y aforar a 90 mililitros con cloruro de sodio al 1%, agitar con una varilla de vidrio o pipeta.
- Transferir esta mezcla en un matraz estéril que contengan perlas de vidrio, agitar hasta obtener una emulsión completa.
- Vaciar 10 mililitros de la emulsión de yema en tubos estériles de 16x150 mm con tapón de rosca y guardar en congelación.

Base de agar sangre (BAB).

La base de agar sangre es adecuada para aislar y cultivar diversos microorganismos de difícil crecimiento.

Fórmula aproximada en g/lt.

Infusión de músculo cardiaco	37.5
Peptona de carne	10.0
Agar	15.0
Cloruro de sodio	5.0
Ajustar el pH final a 7.3 ± 0.3	

Preparación:

Pesar 40 gr. del medio deshidratado y aforar a un litro con agua deionizada. Dejar hidratar entre 15 y 10 minutos y calentar con agitación constante hasta una obtener homogenización completa. Distribuir 3.5 ml en tubos de 13x100 mm con tapón de rosca y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Inclinar los tubos para solidificar y guardarlos en refrigeración a 2 a 8 °C.

Agar triptona y extracto de carne

Fórmula aproximada en g/lt.

extracto de carne	3.00
peptona de caseína	5.00
dextrosa	1.00
Agar	15.00

Ajustar el pH a 7.0 ± 0.2

Preparación:

Pesar los ingredientes y disolver en agua deionizada ajustar el pH calentar agitando frecuentemente hasta disolución completa. Vaciar en frascos porciones de 100 ml y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

T₁N₁

Fórmula aproximada en g/lt

cloruro de sodio	10gr.
Agar-Agar	20 gr.
Triptona	10 gr.

Preparación:

Disolver los componentes en una parte de agua y aforar a 1000 ml con agua deionizada. Dejar reposar durante 10 minutos, ajustar en pH a 7.2 y calentar para su completa disolución, hervir durante 1 minuto. Esterilizar en autoclave durante 15 min. a 121 °C. enfriar a una temperatura aproximada de 40 a 45 °C y vaciar en cajas petri estériles, conservar en refrigeración.

Caldos de cultivo.

Base de caldo tetracionato.

Enriquecimiento selectivo de Salmonella.

Fórmula aproximada g/lit.

Mezclas de peptonas	5.0 g
Sales biliares	1.0 g
Carbonato de calcio	10.0 g
Tiosulfato de sodio	30.0 g

Ph final del medio 7.0 ± 0.1

Preparación:

Pesar 46 g del medio deshidratado y aforar a un litro con agua deionizada. Mezclar hasta su completa homogenización y calentar a ebullición durante un minuto. Envasar en tubos de 16x150 mm, con tapón de rosca, previamente estériles en volúmenes de 10 ml cada uno. No esterilizar en autoclave. Guardar en refrigeración a una temperatura de 2 a 8° C. momentos antes usarlo agregar 0.2 ml. de la siguiente solución yodo-yoduro y 0.1 ml de verde brillante al 0.1 %.

Solución yodo-yoduro

Yodo y cristales	6 g
Yoduro de potasio	6 g
Agua destilada	100.0 ml

Caldo Arginina descarboxilasa.

Fórmula aproximada en g/lt

Agar peptona	5.0 g
Agar extracto de carne	5.0 g
Agar dextrosa	0.5 g
Azul de bromo cresol	0.01 g
Rojo de cresol	0.005 g
Piridoxal	0.005 g
Ph final 6.0 ± 0.2 a $25^{\circ} C$	

Preparación:

Pesar 10 g del medio y aforar a un litro con agua deionizada y calentar suavemente para homogenizar, agregar la L-Arginina (10 g/lt) y mezclar. Verter 2.5 ml en tubos de 13x100 mm con tapón de rosca y esterilizar en autoclave a $121^{\circ}C$ durante 10 minutos, almacenar en refrigeración a una temperatura de 2 a $8^{\circ}C$.

Agua peptonada alcalina.

Fórmula aproximada en g/lt.

Peptona de caseína	10.0 g
Cloruro de sodio	10.0 g
Ajustar el pH a 9.0	

Preparación:

Disolver los componentes en agua deionizada hasta su completa homogenización y aforar a un litro con agua deionizada distribuir en frascos de volúmenes de 450 ml y 10 ml del medio preparado. Esterilizar en autoclave a $121^{\circ} C$ durante 15 minutos y conservar a temperatura ambiente.

Agua peptonada alcalina

Inv. de V. ch en alimentos

Fórmula aproximada en g/lt.

peptona de caseína	10.0 g
--------------------	--------

cloruro de sodio 10.0 g

pH final 8.5 ± 0.2

Preparación:

Disolver los componentes en agua deionizada hasta su completa homogenización y aforar a un litro con agua deionizada, distribuir los frascos en volúmenes de 225 ml, 2.5 ml y 9 ml del medio preparado. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 10 minutos, conservar a temperatura ambiente.

Caldo lauril sulfato de sodio

Fórmula aproximada por g/lt

Lauril sulfato de sodio 0.10 g

Peptona de caseína 20.0 g

Lactosa 5.0 g

Fosfato dipotásico 2.75 g

Fosfato monopotásico 2.75 g

Cloruro de sodio 5.00 g

Ajustas el pH a 6.8 ± 0.2

Preparación:

Pesar 35.6 gr. del medio deshidratado y disolver en un litro de agua deionizada hasta obtener su completa homogenización. Distribuir 10 ml del medio en tubos de 16 x150 mm que contengan campanas de durham, esterilizar en autoclave a 121°C durante 12 minutos, pero que no exceda de 15 minutos. Almacenar a temperatura ambiente.

Caldo verde brillante bilis al 2%

Fórmula aproximada en g/lt.

bilis de buey deshidratada 20.0 g

lactosa 10.0 g

peptona de gelatina 10.0 g

verde brillante 0.0133 g

pH final 7.2 ± 0.2

preparación:

pesar 40 g del medio deshidratado y aforar a un litro con agua deionizada agitar frecuentemente hasta obtener una homogenización total del medio. Distribuir volúmenes de 10 ml. en tubos 16 x150 mm que contengan campanas de Durham, esterilizar a 121°C durante 15 minutos, conservar a temperatura ambiente.

Caldo EC

Fórmula aproximada en g/lt.

digerido pan creativo de caseína	20.0 g
lactosa	5.0 g
mezcla de sales biliares	1.5 g
fosfato dipotásico	4.0 g
fosfato de potasio	1.5 g
cloruro de sodio	5.0 g
pH final	6.9 ± 0.2.

Preparación:

Pesar 37 g del medio deshidratado y aforar con un litro con agua deionizada hasta obtener una homogenización completa. Distribuir en volúmenes de 10 ml en tubos de 16 x150 mm que contengan campanas de durham. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos, enfriar rápidamente. Conservaren refrigeración a una temperatura de 2 a 8 °C.

Caldo infusión de cerebro-corazón.

Fórmula aproximada en g/lt.

Infusión de cerebro de ternera	200.00 g
Infusión de corazón de res	250.00 g
Peptona de gelatina	10.00 g
Dextrosa	2.00 g
Cloruro de sodio	5.00 g
Fosfato Disódico	2.50 g

pH final 7.4 ± 2.0 .

Preparación:

Pesar 35 gr. del medio de deshidratado y aforar a 1 litro con agua deionizada, mezclar hasta obtener una homogeneización completa. Distribuir un volumen de 3 ml en cubos de 13 x 100 ml y 100 ml en frascos de cristal con tapón de rosca. Esterilizar a 121 °C. durante 15 minutos conservar en refrigeración a una temperatura de 2 a 28 °C.

Agua peptonada tamponada	
Peptona de caseína	10.00 g
Cloruro de Sodio	5.00
Fosfato de Potasio monobásico	1.50 g
Fosfato de sodio dibásico	3.5 g
Agua desionizada	1000 ml
pH final	7

Preparación:

Disolver los ingredientes en un litro de agua hasta su completa disolución, ajustar el pH a 7.0, y vaciar porciones de 225 ml en frascos de 1000 ml. esterilizar a 121 °C durante 20 minutos.

Caldo lactosado (preeenriquecimiento para Salmonella)

Fórmula en g/lt.

Extracto de carne	3.0
Peptona de caseína	5.0
Lactosa	5.0
Agua destilada	1000 ml
pH final	6.9 ± 0.2

Preparación:

Dísolver los ingredientes en agua deionizada, distribuir en porciones de 225 ml en frascos de 1000 ml. Esterilizar durante 15 minutos a $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Caldo lauril sulfato de sodio concentración 1.5

Fórmula aproximada por g/lt

Lauril de sodio	0.10
Peptona de caseína	20.0
Lactosa	5.0
Fosfato dipotásico	2.75
Fosfato monopotásico	2.75
Cloruro de sodio	5.00

Ajustar el pH a 6.8 ± 0.2

Preparación:

Pesar 71.2 gr. del medio deshidratado y disolver en un litro de agua deionizada. Distribuir 20 ml del medio en tubos de 22 x 200 mm que contengan campanas de Durham, esterilizar en autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 minutos que no exceda de 15 minutos, mantener a temperatura ambiente.

Caldo lauril sulfato de sodio triple concentración

Fórmula aproximada por g/lt

Lauril sulfato de sodio	0.10
Peptona de caseína	20.0
Lactosa	5.0
Fosfato dipotásico	2.75
Fosfato monopotásico	2.75
Cloruro de sodio	5.00

Ajustar el pH a 6.8 ± 0.2

Preparación:

Pesar 106.8 gr. del medio deshidratado y disolver en agua desionizada. Distribuir 10 ml del medio en tubos de 22 x 200 mm que contengan campanas de Durham, esterilizar en autoclave a 121 °C durante 12 minutos, que no exceda de 15 minutos, mantener a temperatura ambiente.

Caldo T1 No Caldo triptona

Fórmula g/lt

Triptona o Tripticasa 10 g

Cloruro de sodio 0 g

PH final 7.2 ± 0.2

Preparación:

Disolver los ingredientes en agua desionizada, ajustar el pH y distribuir en tubos de 13 x 100 mm en porciones de 1 ml. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Caldo Urea

Fórmula g/lt

Extracto de levadura 0.1 g

Urea 20.0 g

Fosfato monopotásico 9.1 g

Fosfato de sodio 9.5 g

Rojo de fenol 0.01 g

PH final 6.8 ± 0.2

Preparación:

Pesar 3.8 g del medio y disolver en 100 ml de agua deionizada, ajustar el pH y distribuir volúmenes de 1 ml en tubos de 13 x 100 mm, con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave de 5 a 8 libras de presión durante 15 minutos.

Caldo Rappaport Vassiliadis

Fórmula g/lt

Digerido pancreático de caseína	4.54
Cloruro de sodio	7.20
Fosfato dipotásico	1.45
Cloruro de magnesio (anhidro)	13.40
Oxalato de verde de malaquita	0.036
PH final	5.1 ± 0.2

Preparación:

Pesar 26.6 gr. del medio deshidratado en un litro de agua desionizada y agitar frecuentemente hasta su completa disolución. Distribuir volúmenes de 10 ml en tubos de 16 x 150 mm, y esterilizar en autoclave a 116 °C (presión de 10 libras) por 15 minutos.

Caldo EC-MUG

Fórmula en g/lt

Extracto de triptona	20.0
Extracto de lactosa	5.0
Sales biliares No. 3	1.5
Fosfato dipotásico	4.0
Fosfato monopotásico	1.5
Cloruro de sodio	5.0
MUG	0.05

PH final 6.9 ± 0.2 a 25 °C

Preparación:

Pesar 37 gr. medio y disolver en un litro de agua desionizada y agitar hasta su completa disolución. Distribuir volúmenes de 10 ml en tubos de 16 x 150 mm que contengan campanas de Durham. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Medios semisólidos

Medio MIO

Fórmula en g/lt

Extracto de levadura	2.0
Peptona de gelatina	10.0
Peptocaseína	10.0
L-ornitina	5.0
Dextrosa	1.0
Agar	2.0
Púrpura de Bromocresol	0.02
Agar- Agar	2.0

PH final 6.5 ± 0.2

Preparación:

Pesar 31 gr. del medio y aforar a un litro con agua deionizada, calentar hasta ebullición, distribuir volúmenes de 2.5 ml en tubos de 13 x 100 mm con tapón de rosca. Estilizar a 121 °C durante 15 minutos, conservar en refrigeración a una temperatura de 2 a 8 °C.

Medidas de seguridad

Utilizar cubre bocas, bata limpia y cerrada, guantes de asbesto, no abrir la ollas de presión ni los autoclaves, hasta que la presión sea cero. El área debe contener extinguidores y regadera para casos de emergencia.

Medidas de control de calidad

Observación de las características físicas de los medios de cultivo, estas características observables, pueden ser indicativas de algún error técnico, por lo que para cada medio preparado y esterilizado, se deberán observar las siguientes características:

Aspecto

Turbidez

Precipitación

Cambio de color

Anexo 2

Preparación de reactivos

Preparación

Ácido Clorhídrico 1 N

Fórmula:

Ácido clorhídrico (HCl)	8.3 ml
Agua Deionizada	aprox. 100 ml

Preparación:

Añadir a 50 ml de agua deionizada 8.30 ml. de ácido clorhídrico concentrado, homogeneizar y aforar a 100 ml. con agua deionizada, envasar y conservar.

Ácido Sulfúrico 1N

Fórmula:

Ácido sulfúrico (H ₃ SO ₄)	4.704 ml
Agua deionizada	aprox. 100 ml

Preparación:

Añadir a 50 ml. de agua deionizada 4.704 ml. de ácido sulfúrico, mezclar y aforar a 100 ml. con agua deionizada, envasar y conservar.

Telurito de Potasio al 1%

Fórmula:

Telurito de potasio	1.0 grs.
Agua deionizada	100 ml

Preparación:

Disolver 1 gr. e telurito de potasio en dos partes del volumen total de agua aforar a 100 ml. con agua deionizada, envasar y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos, conservar en refrigeración.

Tiosulfato de sodio al 10%

Fórmula:

Tiosulfato de sodio	10 gr.
Agua deionizada	100 ml

Preparación:

Disolver 10 g, de Tiosulfato de sodio en dos partes de agua del volumen total, mezclar y aforar a 100 ml. con agua deionizada, envasar y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos, conservar en refrigeración.

Solución de Hidróxido de sodio 1 N

Fórmula:

Hidróxido de sodio	4.0 gr.
Agua destilada	100 ml

Preparación:

Disolver el hidróxido de sodio y llevar a 100 ml con agua destilada o deionizada.

Solución salina 0.85%

Fórmula:

Cloruro de sodio	0.85
Agua destilada	100 ml

Preparación:

Disolver el cloruro de sodio en el agua y esterilizar a 121 °C ± 1 °C durante 15 minutos.

Solución salina formalizada

Fórmula:

Solución de formaldehído (36-38 %)	6 ml
Cloruro de Sodio (NaCl)	8.5 ml
Agua	1000 ml

Preparación:

Disolver 8.5 de cloruro de sodio en un litro de agua deionizada. Esterilizar a 12 °C durante 15 minutos. Enfriar a temperatura ambiente. Adicionar 6 ml de la solución de formaldehído. No esterilizar después de agregar el formaldehído.

Solución de cloruro de calcio anhidro 0.01 M

Cloruro de Calcio PM = 110.99

Preparación:

Disolver 0.1199 g de cloruro de calcio en 100 ml de agua.

Solución de azul de toluidina 0.1 M

Disolver 3.05 g de azul de toluidina en 100 ml de agua.

Solución amortiguadora 0.05 M Tris- (hidroximetilaminometano)

(tris pH 9) PM = 121.1

Disolver 6.055 g de tris en 100 ml de agua

Solución de Tiosulfato de sodio 0.1 N ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

Fórmula

Tiosulfato de sodio	25 gr.
Agua destilada	1000 ml

Preparación.

Disolver 25 gr. de Tiosulfato de sodio pentahidratado en una parte de agua destilada, aforar a 1000 ml. cuando se tenga una homogenización completa.

Solución reguladora de fosfato de fosfatos (solución concentrada)

Fórmula:

Fosfato de Sodio monobásico	34.0 g
Agua	1000 ml

Preparación:

Disolver el fosfato en 500 ,ml de agua y ajustar el p-h a 7.2. con solución de NaOH 1N. Aforar a un litro con agua. Almacenar.

Solución reguladora de fosfatos (solución de trabajo)

Fórmula:

Solución reguladora de fosfato concentrada	1.25 ml
Agua deionizada	aprox. 1000 ml.

Preparación:

Tomar 1.25 ml. de la solución de fosfato concentrada y aforar a 1000 ml. con agua deionizada. Envasar 90 ml en frascos y 9 ml. en tubos de ensaye con rosca. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Solución verde brillante al 0.1 %

Fórmula:

Verde brillante	0.1 g
Agua destilada	100 ml

Preparación:

Disolver en polvo de verde brillante en una parte deionizada y aforar a 100 ml. envasar en frasco de color ámbar y almacenar a temperatura ambiente.

Solución Madre de yodo.

Fórmula:

Cristal de yodo resublimado	6 g
Yoduro de potasio	6 g
Agua destilada	100 ml

Preparación:

Disolver los reactivos hasta si completa disolución en agua destilada. Envasar en frascos de color ámbar.

Medidas de seguridad

Utilizar bata de laboratorio, cubre bocas, y cuando los reactivos lo requieran utilizar la campana de extracción durante su preparación. En caso de quemaduras por ácido o ingestión accidental de algún reactivó, informar inmediatamente al jefe del laboratorio y tomar las medidas señaladas en el procedimiento de bioseguridad del laboratorio

Medidas de control de calidad

Llevar un registro de preparación de cada reactivó. Utilizar soluciones valoradas para su validación, en caso que se requiera, realizar inspección de sus aspecto.