



Universidad Nacional  
Autónoma de México  
Facultad de Química  
Departamento de Biología

# Métodos Microbiológicos para el Análisis de Alimentos



Editores

**Hugo Antonio Hernández Pérez**  
**Martha Giles Gómez**



# **MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS PARA EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS**





**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**Facultad de Química**  
**Departamento de Biología**



# **MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS PARA EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS**

## **Editores**

- **Hugo Antonio Hernández-Pérez**
- **Martha Giles-Gómez**

## **Autores**

- **Ana Lilia Cruces Martínez**
- **Alejandro Camacho Cruz**
- **Elsi Ideli Juárez Arroyo**
- **Norma Angélica Camacho de la Rosa**
- **Aurora Ortegón Ávila**
- **Aleida Mina Cetina**
- **María Mercedes Palao Rincón**
- **Olga del Carmen Velázquez Madrazo**

## **Coordinación de fotografías**

- **Hugo Antonio Hernández-Pérez**
- **Ana Lilia Cruces Martínez**

Primera edición: 2021

Fecha de edición: 28 de enero de 2021

D.R. © 2021 UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
Ciudad Universitaria, Alcaldía Coyoacán,  
C.P. 04510, Ciudad de México.

**ISBN: 978-607-30-4232-1**

“Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio,  
sin la autorización escrita del titular de los derechos patrimoniales”.

Impreso y hecho en México

**Publicación aprobada por el Comité Editorial de la Facultad de Química**

# CONTENIDO

PREFACIO .....	ix
FINANCIAMIENTOS .....	xi
1. Procedimientos para la toma, transporte y manejo de muestras de alimentos para su análisis microbiológico .....	1
2. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico .....	19
3. Determinación de microorganismos indicadores .....	29
4. Determinación de bacterias mesofílicas aerobias .....	33
5. Determinación de coliformes totales por cuenta en placa .....	45
6. Determinación de mohos y levaduras en alimentos .....	53
7. Método aprobado para la estimación de la densidad de coliformes totales, fecales y <i>E. coli</i> por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua .....	67
8. Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i> enterotoxigénico en alimentos .....	87
9. Detección de <i>Salmonella</i> spp. en alimentos.....	101
10. Método para la determinación de <i>Vibrio cholerae</i> en alimentos, hielo y agua .....	121
11. Método para la determinación de <i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos .....	147
12. Métodos alternativos de pruebas convencionales de análisis microbiológicos .....	163
13. Identificación bacteriana con el sistema VITEK® 2 bioMérieux .....	199
14. Evaluación de higiene en superficies vivas e inertes.....	209
15. Evaluación de higiene por métodos rápidos.....	221

16. Monitoreo del ambiente .....	229
17. Identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	233

## ANEXOS

ANEXO I. Medios de cultivo.....	253
ANEXO II. Diluyentes, soluciones y reactivos .....	309
ANEXO III. Tablas del número más probable.....	321
ANEXO IV. API® 20E.....	329
ANEXO V. Información de tarjeta ID-GN VITEK® 2 Systems.....	337
ANEXO VI. Especificaciones primers empleados en el PCR multiplex de <i>Listeria Monocytogenes</i> .....	343

## PREFACIO

*Métodos microbiológicos para el análisis de alimentos* representa el esfuerzo que el Colegio de Profesores de Microbiología de Alimentos, del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la UNAM, ha desarrollado arduamente para que los alumnos que cursan la asignatura posean un hilo conductor durante la realización de los ejercicios prácticos que ejecutarán a lo largo del semestre.

Los profesores que hemos participado en esta edición consideramos al aprendizaje experimental de calidad como un pilar fundamental en la formación de nuestros estudiantes, quienes convertidos en profesionales del área de la salud deberán poseer un juicio crítico y la capacidad tanto teórica como experimental de responder a las necesidades sanitarias que requiere nuestro país.

La información que comprende esta obra ha sido enriquecida por cada uno de los académicos que formamos la plantilla de docentes en la asignatura, quienes desde nuestro conocimiento, investigación, experiencia profesional y docente hemos aportado las herramientas que consideramos necesarias y elementales en la formación de nuestros alumnos.

El contenido ha sido considerablemente detallado, homogenizado y revisado para garantizar el perfecto entendimiento de los análisis que en él se presentan. La revisión de las Normas Oficiales Mexicanas vigentes o, en su caso, que entrarán en vigor, fueron nuestra guía en la organización de este documento y el eje central de los ejercicios aquí presentados.

Los profesores que participamos deseamos agradecer a nuestros alumnos, quienes son el objeto de esta unión de voluntades, por impulsarnos a seguir en este proceso de mejora continua y los alentamos a consultar esta valiosa herramienta que ahora se encuentra en sus manos para optimizar su proceso de enseñanza-aprendizaje.

También, los autores agradecemos al Jefe del Departamento de Biología, Dr. Rodolfo Pastelín Palacios, y a la Secretaría de Apoyo del Departamento de Biología, QFB María del Pilar Granada Macías, por el apoyo brindado para el trámite de la publicación de este documento ante el Comité Editorial de la Facultad de Química, UNAM.

**Dr. Hugo Antonio Hernández Pérez**



## FINANCIAMIENTOS

El ejercicio experimental “**Identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**” contenido en esta obra fue logrado gracias a los financiamientos de los proyectos:

- **DGAPA-PAPIME PE205606**  
“**Identificación molecular de cepas bacterianas en el Cepario de la Facultad de Química**”.
- **DGAPA-PAPIME PE203410**  
“**Subtipificación de microorganismos patógenos en muestras clínicas y de alimentos**”.
- **DGAPA-PAPIME PE207315**  
“**Transformación bacteriana de genes codificados en plásmidos**”.



# **1** Procedimientos para la toma, transporte y manejo de muestras de alimentos para su análisis microbiológico

---

## **OBJETIVOS**

- Comprender la importancia del muestreo fidedigno para tener un análisis microbiológico de alimentos.
- Valorar la importancia de los procedimientos para la toma, transporte y manejo de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- Realizar la toma, transporte y manejo de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

## **GENERALIDADES**

El análisis microbiológico de un alimento se realiza principalmente por tres razones:

- Realizar el control de la calidad y determinar la vida de anaquel.
- Verificar las técnicas de manipulación y producción higiénica.
- Sospechar de intoxicaciones o infecciones a través de alimentos.

En la mayoría de los casos, el control de calidad se realiza por interés del productor para demostrar la calidad del producto que elabora y, si es posible, la superioridad frente a sus competidores. Sin embargo, el control sanitario de los alimentos plantea la necesidad de indicar una fecha de caducidad que garantice el periodo útil o de seguridad para consumir dichos alimentos, esta fecha se establece con base en la vida de anaquel del producto.

El incremento en la demanda de los consumidores por productos de buena calidad ha marcado la pauta sobre la producción higiénica de los alimentos, así como el análisis para determinar las condiciones de almacenamiento o manipulación deficientes como parte del control de calidad de los mismos.

En este sentido, es esencial la toma de una muestra del alimento con el fin de obtener resultados confiables. El muestreo debe diseñarse de tal forma que permita tomar una muestra representativa del alimento por analizar, así como la recolección de cualquier dato útil.

Otro aspecto importante para tomar en cuenta es la uniformidad en los análisis, debido a que podría llegarse a conclusiones erróneas; por ejemplo, los resultados que se expresan como presencia o ausencia de algún género de microorganismo no son de valor, a menos que se especifique la cantidad del alimento analizado. Las cuentas numéricas de microorganismos pueden variar de forma considerable, de acuerdo con la técnica analítica desarrollada, así como con los medios de cultivo utilizados en la misma, entre otros factores; esta variabilidad se elimina utilizando el mismo método de dilución, medios de cultivo, tiempos y temperaturas de incubación, etcétera, de aquí la importancia de la aplicación de las Normas Oficiales. Por último, la evaluación de la higiene del producto y la aceptabilidad por parte del consumidor pueden seguirse apropiadamente sólo si se tiene el historial del mismo.

En casos de envenenamiento alimentario, el muestreo se dirige primordialmente al producto consumido por el demandante; sin embargo, cualquier esfuerzo deberá realizarse para coleccionar tanto los remanentes del alimento sospechoso, platillo de la comida ingerida, así como otros lotes obtenidos durante la misma recolección obtenida del establecimiento, incluso si no se trata del alimento sospechoso será de gran valor su análisis. Por otra parte, si el microorganismo causante del envenenamiento se conoce, la evaluación puede limitarse a su búsqueda.

En el diseño del plan de muestreo es muy importante que toda persona implicada en la recolección y envío de las muestras, así como el personal del laboratorio y los analistas que realizan la interpretación de los resultados sean consultados en las primeras etapas del muestreo y análisis microbiológico de las muestras; por lo tanto, deberán definirse claramente los objetivos del análisis para evitar pérdida de tiempo y esfuerzo. Todos los análisis microbiológicos tienen sus limitaciones y éstas se deberán tener presentes antes de tomar cualquier acción seguida de un reporte del laboratorio.

El número de unidades que comprende una muestra de un lote de alimento determinado deberá ser estadísticamente representativa, de acuerdo con la NMX-Z-12-1987, partes 1, 2 y 3 basada en Military Standard (Mil Std 105-D), Norma Militar Americana. La composición y naturaleza de cada lote afecta a la

homogeneidad y uniformidad del total de la muestra. Un procedimiento estadístico de muestreo correcto, dependiendo si el alimento es sólido, semisólido, viscoso o líquido, deberá determinarse por el muestreador apoyado en la NOM-109-SSA-1-1994, la cual determina los “Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico”.

En un muestreo es importante tener presente el objetivo del análisis; por ejemplo, si éste se realiza como control sanitario de forma rutinaria o, por el contrario, se investiga una contaminación por algún microorganismo patógeno en particular; otro aspecto importante para obtener resultados confiables es que la toma de muestras debe ser al azar de cada lote, para asegurar la representatividad del producto por analizar, además es indispensable tener un control microbiológico de los contenedores usados en la toma de muestras, lo cual se logra manteniendo uno de ellos vacío, pero expuesto a las mismas condiciones de recolección de la muestra; también se debe considerar que de acuerdo con la capacidad de estos recipientes y la cantidad de muestra tomada de cada envase correspondiente a un lote, será el número que de ellos se necesite; en el aspecto cuantitativo una muestra unitaria consiste de un mínimo de 100 g de alimento, que es el tamaño usual de empaque para el consumidor del producto.

Las condiciones de conservación, transporte, tiempo comprendido entre la recolección de la muestra, su entrega en el laboratorio, así como la realización del análisis influyen notoriamente en los resultados obtenidos, ya que la población microbiana puede sufrir cambios cualitativos y cuantitativos, esto se comprueba en los productos perecederos.

Cabe destacar la importancia del muestreo y la conservación para los alimentos perecederos, ya que para fines oficiales, la Ley General de Salud señala claramente que después de la notificación de los resultados del análisis practicado, si existe alguna duda sobre la veracidad de éstos, el particular puede impugnar dentro del plazo contemplado en la misma Ley, lo que da como consecuencia que la Secretaría de Salud analice la muestra testigo en un laboratorio de tercería que ésta señale en presencia de las partes interesadas y el resultado obtenido sea el que en forma definitiva acredite si el producto en cuestión reúne o no los requisitos y especificaciones sanitarias. Sin embargo, los alimentos aún en condiciones apropiadas de conservación, pueden sufrir cambios significativos en sus características biológicas y/o fisicoquímicas, provocando que los resultados de las muestras testigo sean improcedentes.

Cualquier información relevante, como la que a continuación se señala, debe acompañar a la muestra del alimento para asegurar que estará sujeta al análisis más adecuado y permitir que el analista evalúe adecuadamente los resultados:

- Nombre y autoridad del oficial muestreador.
- Número de identificación de la muestra.
- Fecha, hora y lugar del muestreo.
- Descripción de la muestra incluyendo número de lote, código de enlatado, etc., y datos de caducidad (útese por tanto tiempo, mejor antes de tanto tiempo, etc.).
- Razón del muestreo.
- Nombre del propietario, fabricante, productor, importador, vendedor, comprador, etc.
- El proceso y fecha de cocción (si se conoce) de alimentos cocidos.
- País de origen, condiciones de almacenamiento en ese país, condiciones y tiempo de transporte (si se conocen).
- Ciudad de origen.
- Condiciones de almacenamiento del lugar del muestreo.
- Otros factores importantes; por ejemplo, la condición del empaque, humedad, sanitización.
- Método de muestreo (al azar a través del lote, al azar a través de unidades accesibles, etc.).
- Condiciones de almacenamiento y transporte desde que la muestra fue tomada.
- Detalles clínicos y epidemiológicos (en caso de sospecha de envenenamiento alimentario, así también en caso de que se considere como fuente de contaminación con patógenos).

Las muestras de alimentos deben ser recibidas en el laboratorio en contenedores de varios tipos y utilizarse las técnicas de asepsia al abrirse. El contenedor deberá estar desinfectado con alcohol al 70% o estéril, si es necesario, para evitar la contaminación de la muestra. Otros lotes de un producto similar pueden proporcionar un historial útil y deberán evaluarse junto con cualquier muestra sospechosa. Los siguientes detalles deberán acompañar al formato:

- **Apariencia.** Describir la muestra en términos generales, por ejemplo: “70.0 g de rebanada de jamón cocido, envuelta en papel, color rosado”. Deberán registrarse los signos de deterioro, color anormal y presencia de hongos.
- **Textura.** El deterioro bacteriano puede causar que los productos se tornen suaves o semi-líquidos, esto aplica particularmente a los productos cárnicos.
- **Olor.** Éste es un indicador de descomposición o contaminación.

Un análisis organoléptico incluye el sabor, pero **ÉSTE NO DEBERÁ REALIZARSE EN EL LABORATORIO.**

El acondicionamiento y el estado o condición de la muestra o espécimen recibido para su análisis son primordiales. Si las muestras se colectan o manejan inapropiadamente, o bien, no son representativas de un lote, los resultados del análisis no serán significativos. Debido a que la interpretación de envíos de lotes considerables de alimentos se basa en el análisis de una muestra relativamente pequeña del mismo, los procedimientos para el muestreo deben aplicarse de manera uniforme. Una muestra representativa es esencial cuando los patógenos o sus toxinas se distribuyen escasamente dentro del alimento, o bien, la liberación del lote depende de demostrar el contenido bacteriano en relación con la normatividad.

El número de unidades que abarcan una muestra representativa a partir de un lote de un producto alimenticio debe ser estadísticamente representativa. La composición y naturaleza de cada lote afecta la homogeneidad y uniformidad del total de la muestra. El procedimiento de muestreo apropiado dependiendo de si el alimento es sólido, semisólido, viscoso, debe ser determinado por el recolector al momento del muestreo.

Siempre que sea posible, se debe enviar las muestras al laboratorio en su empaque original sin abrir. Si los productos se encuentran en sacos, bultos, o bien, en contenedores muy grandes para ser remitidos al laboratorio, se deben transferir porciones significativas en contenedores estériles bajo condiciones asépticas. No debe verse afectada la esterilidad del equipo de muestreo y el uso de la técnica aséptica. Esterilizar para este efecto piezas completas en acero inoxidable de cucharas, fórceps, espátulas y tijeras en autoclave y horno para calor seco. Utilizar una lámpara de propano o sumergir el instrumento en alcohol e ignición es peligroso e inadecuado para esterilizar el equipo a utilizar.

Emplear contenedores que se encuentren limpios, secos, irrompibles, de boca ancha, estériles y de un tamaño adecuado para las muestras del producto a analizar.

Los recipientes como jarras de plástico o latas de metal que sean irrompibles deben cerrar herméticamente. Cuando sea posible evite los contenedores de vidrio, ya que pueden romperse y contaminar el alimento. Para materiales secos, emplear cajas de metal estériles, latas, bolsas o paquetes con cierre adecuado. Las bolsas de plástico estériles (sólo para materiales secos no congelados) o botellas de plástico son útiles para el muestreo en la línea de producción. Se debe tener cuidado de no sobrellenar las bolsas o permitir la punción por el cierre de alambre de la misma.

Identificar cada unidad de muestra (se define posteriormente), con un trozo de *maskingtape* marcado de manera adecuada. No emplear una pluma para marcar la bolsa, ya que la tinta puede penetrar al empaque. Cuando sea posible, obtenga al menos 100 g de unidad de muestra. Envíe controles cerrados y abiertos de los contenedores estériles con la muestra.

Las muestras se deben entregar al laboratorio rápidamente bajo la condición de almacenamiento original y más parecida a como se encontraban en el lugar de toma de muestra. Cuando se colecten muestras líquidas, se deberá tomar una muestra adicional para el control de la temperatura. Se deberá verificar la temperatura de la muestra control, al momento del muestreo y al momento de la recepción en el laboratorio. Registre para todas las muestras los tiempos y fechas de la recolección, así como de la llegada al laboratorio. Los alimentos secos o enlatados que no son perecederos y se recolectan a temperatura ambiente no requieren refrigeración. Los alimentos refrigerados o congelados deben transportarse en contenedores aislados aprobados de construcción rígida, de tal manera que lleguen al laboratorio sin cambio. Las muestras congeladas deben recolectarse en contenedores pre-enfriados.

Colocar los contenedores en congeladores lo suficientemente grandes para su enfriamiento a profundidad. Mantener todo el tiempo las muestras congeladas. En el caso de muestras refrigeradas, excepto mariscos y moluscos en concha, refrigerarlas de 0 a 4 °C, hasta su llegada al laboratorio. Los productos refrigerados no deben congelarse. A menos que se especifique, las muestras refrigeradas no deben ser analizadas en un periodo mayor a 36 horas posterior a su recolección. Existen condiciones especiales que son aplicables a la colección y almacenamiento de mariscos sin concha, mariscos no congelados y moluscos en concha. De inmediato, empacar las muestras de mariscos sin concha en hielo *frappé* (no se especifica la temperatura), hasta su análisis; mantenga los mariscos a una temperatura ligeramente superior a la congelación, pero por debajo de 10 °C. Examinar los mariscos y moluscos en concha dentro de las primeras 6 horas a partir de su recolección o máximo en menos de 24 horas.

## Planes de muestreo

### 1. Especies de *Salmonella*

#### a) Recolección de muestras

Debido a la presencia continua de *Salmonella* en los alimentos, la recolección de las muestras para este microorganismo ha recibido especial atención de los comités de diversos organismos. Cada uno de estos comités ha recomendado variar el número de muestras a partir de un lote de alimento en específico de acuerdo con la categoría de muestreo a la cual el alimento pertenece. Por lo general, la asignación para un muestreo o categoría de alimento depende de 1) la sensibilidad del grupo consumidor (por ejemplo, la tercera edad, los inmunocomprometidos y los infantes); 2) la posibilidad de que en el alimento pueda presentarse una etapa letal para *Salmonella* durante el procesamiento o en casa; y 3) la historia de asociación de *Salmonella* con el alimento. La selección de un plan de muestreo depende principalmente de los primeros dos puntos mencionados. El plan de muestreo para analizar este microorganismo incluye 3 categorías de alimentos. Para consultar estas categorías y los planes de muestreo particulares de cada una, puede consultarse el Capítulo 1 del Bacteriological Analytical Manual (BAM), "Muestreo de alimentos y preparación del homogeneizado de muestra" (<https://bit.ly/2nyAYOm>).

### 2. Cuenta de microorganismos aerobios en placa, coliformes totales, *Escherichia coli* (incluyendo cepas enteropatogénicas), *Staphylococcus* spp., *Vibrio* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp., *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens*.

- a) Recolección de la muestra. Para cualquier lote de alimento coleccionar al azar 10 submuestras de 30 mL o gramos. No rompa o corte empaques de tamaño más grande para obtener las muestras de 30 g. Colecte la unidad intacta si es que la submuestra es mayor a 30 mL o g.
- b) Análisis de la muestra. Realizar el análisis acorde con el procedimiento para el grupo microbiano indicado.

## Equipo y materiales

1. Licuadora. Existen varias clases, se deberá emplear una licuadora que posea velocidad variable o reóstato. El término “licuadora de alta velocidad” se aplica a 4 aspas con filo, de acero inoxidable dentro de un recipiente lobular de 4 paredes con deflectores en cada una, que giran a una velocidad de 10 000 a 12 000 rpm, o bien, una velocidad de agitación similar. Los sólidos suspendidos se minimizan a una pulpa fina por acción de las aspas y por el contenedor lobular, que genera remolinos del sólido dentro de las aspas.
2. Esterilizar la jarra de la licuadora de vidrio o metal de capacidad de 1 000 mL, con tapa, resistente al autoclave a 121 °C por 60 min.
3. Balanza con pesas; 2 000 g de capacidad, sensibilidad de 0.1 g.
4. Matraces o frascos estériles de 250 mL, cubiertos con papel aluminio.
5. Pipetas graduadas estériles de 1.0 y 10.0 mL.
6. Solución amortiguadora de fosfatos, esterilizada en matraces o botellas. Volumen final  $90.0 \pm 1$  mL.
7. Cuchillos, pinzas, tenedores, tijeras, cucharas de mesa, abatelenguas (para el manejo de muestras).

### A. Manejo de muestras en el laboratorio y preparación del homogeneizado de muestra

Tan pronto como la muestra de alimento llega al laboratorio, el analista deberá anotar las condiciones físicas generales de la misma. Si la muestra no puede ser analizada de inmediato, deberá ser almacenada como se describe posteriormente. Si la muestra va a ser analizada para fines regulatorios, para investigación de un brote por consumo de un alimento o para una inspección bacteriológica, es esencial el seguimiento estricto a las recomendaciones descritas a continuación.

### B. Recibo de muestras

1. **Estado del contenedor de muestras.** Examinar los contenedores de muestras con el objetivo de localizar posibles defectos físicos graves. Inspeccionar cuidadosamente bolsas y botellas para comprobar que no presentan hoyos, fracturas, etc.; además corroborar que no exista contaminación cruzada proveniente de los defectos descritos y que invalidaría el análisis.

2. **Etiquetado e historial.** Cada muestra debe estar sellada con tapa y acompañada de un reporte de recolección completo (como el que se indicó) y registrarse el número de muestra y la fecha. Asignar a cada muestra unitaria un número individual y analizarla separadamente, a menos de que se trate de una muestra compuesta.
3. **Seguimiento de un plan de muestreo.** La mayoría de los alimentos se recolectan de acuerdo con un plan de muestreo. Dependiendo del alimento y el tipo de análisis diseñado, determinar el plan más adecuado.
4. **Almacenamiento.** Si es posible, examinar las muestras inmediatamente después de recibirlas. Sin embargo, si el análisis debe ser pospuesto, almacenar las muestras congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su realización. Refrigerar las muestras perecederas no congeladas de  $0\text{-}4\text{ }^{\circ}\text{C}$  por un periodo máximo de 36 h. Los alimentos no perecederos, enlatados o de baja humedad se almacenarán a temperatura ambiente hasta el análisis.

### C. Descongelamiento

Utilizar una técnica aséptica para el manejo del producto congelado. Antes de manipular o analizar la muestra de alimento, limpiar las áreas de trabajo y áreas circundantes. Aunado a lo anterior, humedecer el área de trabajo y las áreas circundantes con un agente germicida comercial. De preferencia, no descongelar las muestras antes del análisis. Si es necesario atemperar la muestra congelada para tomar una porción analítica, descongelar en el empaque original o en el contenedor en el que se recibió en el laboratorio. Cuando sea posible, evitar la transferencia de la muestra a un segundo contenedor para descongelar. Normalmente, la muestra puede ser descongelada de  $2\text{ a }5\text{ }^{\circ}\text{C}$  en 18 h. Si se desea un descongelado rápido, someta la muestra a una temperatura menor a  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  por un tiempo no mayor a 15 min. Cuando se descongele una muestra a temperatura elevada (mayor a  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), agitar la muestra continuamente en un baño de agua con termostato.

#### **D. Mezclado**

En las muestras alimenticias puede presentarse una distribución no homogénea de los microorganismos. Para asegurar una distribución más uniforme, homogenizar de forma circular las muestras unitarias líquidas y las muestras secas, con una cuchara estéril u otro utensilio antes de tomar la cantidad a analizar a partir de una muestra de 100 g o mayor. Si el contenido del empaque es, obviamente, no homogéneo (por ejemplo, una comida congelada), examinar la muestra analítica del alimento macerado o, de preferencia, analizar cada porción por separado, dependiendo del objetivo del análisis.

#### **E. Pesado**

Tare el vaso de la licuadora o la bolsa de Stomacher®; entonces pese exactamente ( $\pm 0.1$  g) en condiciones asépticas dentro del vaso de la licuadora, el tamaño de muestra analítica recomendado (si es congelado, pese antes de descongelar). Adicione la cantidad de diluyente necesario para tener una dilución decimal ( $10^{-1}$ ). Si la muestra completa pesa menos de la cantidad requerida para el análisis, pese una cantidad equivalente a la mitad de la muestra y ajuste la cantidad del diluyente conforme ésta. El volumen total de muestra más diluyente deberá cubrir por completo las aspas del vaso de la licuadora.

#### **F. Molido y diluido**

Adicionar el volumen de solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 7.2 o agua peptonada al 0.1% estéril necesario para obtener la primera dilución decimal al vaso de licuadora y mezclar por 2 min. Este mezclado será la dilución  $10^{-1}$ . Realizar rápidamente diluciones decimales del homogenizado original, usando pipetas que descarguen el volumen requerido con precisión. No medir menos del 10% del volumen total de la pipeta; por ejemplo, no use pipetas con capacidad mayor a 10 mL para medir volúmenes menores a 1 mL; para medir volúmenes de 0.1 mL, no utilizar pipetas con una capacidad mayor a 1 mL.

Preparar todas las diluciones decimales con 90 mL de diluyente estéril y 10 mL de la dilución previa a menos que se especifique de otra manera. Mezclar todas las diluciones vigorosamente 25 veces en un arco de 30 cm en 7 s. No deben excederse más de 15 min. desde el licuado de la muestra hasta que las diluciones correspondientes sean vertidas en el medio de cultivo adecuado.

### G. Homogeneización con Stomacher®

La molienda con Stomacher® (**Figura 1.1**), como un medio para la preparación de muestras fue introducida por Sharpe y Jackson en 1972. Fue sugerida como una alternativa muy útil para la molienda en la preparación de alimentos para análisis microbiológico. Los Stomacher® (Tekmar Co., Cincinnati, OH) están disponibles en el mercado en tres tamaños: 80, 400 y 3500, para el manejo de volúmenes de 8-80, 40-400 y 300-3000 mL, respectivamente. El principio de operación es muy sencillo. La muestra de alimento con el diluyente se coloca en una bolsa de plástico estéril y se introduce en el Stomacher®, una caja de metal rectangular con paletas de metal dentro, de tal manera que las paletas golpeen sobre la bolsa. Estas paletas, accionadas por un motor a velocidad constante, se moverán hacia adelante y atrás golpeando literalmente la muestra. Este golpeteo liberará a las bacterias de las partículas de alimento, debido en parte a la agitación violenta del líquido y en parte por la compresión que sufre la muestra por las paletas. No se necesita una homogeneización completa de la muestra.

Las muestras de alimento se colocan en bolsas de plástico, por lo cual se recomienda que muestras con huesos u otros objetos punzantes no se preparen con este método.



**Figura 1.1** Forma correcta de introducir la muestra dentro del Stomacher®.

## **Procedimiento para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico descritas en el Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994**

### ***MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES***

- Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.2, esterilizado en botellas con 90 mL del diluyente.

### ***SOLUCIONES, REACTIVOS E INDICADORES***

- Frasco con etanol o isopropanol al 70% (V/V).

### ***MATERIAL Y EQUIPO***

- Algodón.
- Autoclave equipada con termómetro de mercurio calibrada a  $121 \pm 1$  °C.
- Balanza, con pesas; 2 000 g de capacidad, sensibilidad de 0.1 g.
- Bata, cofia, cubreboca y guantes estériles.
- Bolsas de polietileno estériles de varias medidas.
- Cerillos.
- Cinta testigo.
- Etiquetas autoadheribles.
- Frascos de boca ancha con tapa de rosca o tapón esmerilado de material esterilizable, no tóxico, de tamaño acorde con la cantidad de la muestra deseada.
- Hieleras de poliestireno o de otro material aislante.
- Hielo o bolsas refrigerantes.
- Horno que alcance una temperatura de  $170 \pm 5$  °C.
- Jarra de vidrio o metal de alta velocidad, 1 000 mL, con tapa, resistente a esterilización en autoclave por 15 min a 121 °C.
- Lámparas de alcohol.
- Licuadora. Muchos tipos de licuadora están disponibles. Utilizar licuadoras con varias velocidades de operación o reóstato. El término de "licuadora de

alta velocidad” se designa a una mezcladora con cuatro aspas de acero inoxidable, curvas y filosas, encontradas en el fondo de una jarra o vaso a 10 000-12 000 rpm o con una acción equivalente de rotación. Los sólidos suspendidos son reducidos a una pulpa fina por acción de las aspas y por el contenedor, volviéndolos polvo.

- Marcadores indelebles.
- Matraces estériles de 250 mL, cubiertos con papel de aluminio.
- Papel aluminio.
- Papel estraza.
- Pipetas graduadas estériles de 1 y 10 mL.
- Termómetros metálicos (dos, si es necesario) para la toma de temperaturas de alimentos con rangos de -40 a 100 °C, con intervalos no superiores a 1 °C.
- Utensilios para el manejo de muestras estériles (de acero inoxidable o de cualquier otro material que no provoque cambios que puedan afectar los resultados): muestreadores, cucharones, espátulas, cuchillos, pinzas, etcétera.

## **PROCEDIMIENTO**

### **1. Preparación del material**

- Todo el material e instrumentos de muestreo que se utilicen para la toma, manejo y transporte de muestras, que van a estar en contacto directo con el alimento, deben estar limpios, estériles y libres de sustancias que pudieran afectar la viabilidad de los microorganismos.
- El material para la toma de muestra que requiera esterilización, se envolverá en forma individual, debidamente identificado, con papel de estraza antes de esterilizarlo.
- La tapa de los frascos se protegerá con papel de estraza o aluminio, fijándolos adecuadamente.
- Colocar cinta testigo en el material a esterilizar.
- El material que se utilice para la toma de muestra debe ser esterilizado en autoclave a 121 °C durante 15 minutos o en horno a 170 °C por dos horas, de acuerdo con su naturaleza.

- Una vez esterilizado el material debe ser protegido para evitar contaminación posterior.
- Aunque esto no se considera una práctica correcta, de ser necesario, si se requiere mayor número de utensilios, limpiar los que hayan sido usados y empaarlos con etanol o isopropanol al 70%, posteriormente flamearlos y colocarlos en recipientes estériles para evitar su contaminación o utilizarlos de inmediato.

## **2. Toma de muestra**

El procedimiento para la toma de muestra dependerá del tipo de producto y de la finalidad del examen.

### **A. Obtención**

- La toma de muestra de productos envasados con presentación comercial para venta al menudeo se llevará a cabo en forma aleatoria y no aséptica, tomándose del mismo lote y en cantidad suficiente para sus análisis, enviándose al laboratorio tal como se presentan al consumidor.
- Tratándose de productos envasados en recipientes grandes, es preciso abrir éstos y extraer la muestra en condiciones asépticas para evitar la contaminación microbiana.
- Los alimentos expuestos al aire libre y a otras contaminaciones, no requieren precauciones estrictamente asépticas.
- Cuando se requiera tomar muestras asépticamente, éstas no deben tomarse en áreas donde las condiciones sanitarias puedan dar lugar a la contaminación de las mismas.
- Es importante que el personal que lleve a cabo el muestreo, antes de realizarlo, se lave las manos y los brazos hasta los codos, además de cepillarse las uñas con jabón. Para muestreo aséptico debe utilizar: bata, cofia y cubreboca. De ser necesario el contacto directo de las manos con el producto, deberán usarse guantes estériles.
- La toma de muestra debe hacerse con rapidez, pero con cuidado. Los recipientes para la toma de muestra deben abrirse únicamente al momento de introducir ésta y cerrarlos de inmediato. No tocar el interior de los envases y evitar que la tapa se contamine colocándola sobre un trapo estéril desechable.

- Cuando sea necesario tomar la temperatura, la muestra que se utilice para tal fin deberá ser diferente de la que se envía para su análisis.
- Para alimentos preparados sin envasar de consumo inmediato, se recomienda que la persona que elabora los alimentos sea la que introduzca la muestra a los recipientes o bolsas estériles con los utensilios que emplea normalmente. Los alimentos que se muestrean en caliente se deben conservar y trasladar a la temperatura en que se muestrearon, esto sólo si el traslado es menor a una hora; de lo contrario, deben enfriarse a temperatura ambiente y trasladarse en condiciones de refrigeración.
- En el caso de alimentos líquidos o semilíquidos, se deberá agitar o mezclar hasta conseguir homogeneizar y después efectuar la toma de la muestra en diferentes niveles.
- En alimentos sólidos, cuando sea necesario cortar el producto, debe muestrearse con ayuda de utensilios estériles como sacabocados, cucharas, cuchillos, etcétera.
- En productos a granel, tomar la muestra de varios puntos del contenedor para obtener una muestra representativa.
- Cuando la toma de muestra se realice en un conducto de salida o una compuerta de una partida a granel, antes de obtener la muestra se deben dejar pasar las primeras fracciones del producto para limpiar dicha salida con el flujo.

## **B. Productos perecederos**

- Los alimentos preparados de consumo inmediato que se venden sin envasar o a granel se consideran como alimentos perecederos y en los productos no envasados, en los cuales no está definida su vida útil o de anaquel, se determinará la fecha de caducidad con base en productos de características similares.
- Para productos envasados que no contengan fecha de caducidad, se consideran como no perecederos.
- Para productos perecederos, la toma de muestra para efecto de vigilancia sanitaria será únicamente por duplicado, la primera se enviará al laboratorio oficial para su análisis y la segunda se quedará en poder del interesado para su análisis particular si es necesario.

### **C. Identificación de la muestra**

- En la toma de muestra es indispensable identificar el recipiente de manera clara, inmediatamente antes o después de colocar en él la muestra, mediante rótulo o etiqueta (indelebles), con los siguientes datos: fecha, lugar, hora del muestreo, número de lote y temperatura de la toma de muestra si es que procede.
- La etiqueta deberá colocarse entre la tapa y el cuerpo del frasco, la caja, en el nudo o cierre de la bolsa, en forma tal que se evite que la muestra sea alterada o violada.

### **D. Conservación y transporte**

- El manejo y transporte de las muestras deberá efectuarse de tal manera que se impida su ruptura, alteración o contaminación, evitando su exposición a la luz solar directa.
- Las muestras deben entregarse al laboratorio lo más rápido posible. Los alimentos perecederos se transportarán bajo condiciones de temperatura de 2 a 8 °C y deben mantenerse a esa temperatura hasta el momento de realizar las pruebas, las cuales deben iniciarse dentro de las 24 h siguientes a su recolección. En caso de alimentos congelados, la temperatura no debe ser mayor de 0 °C, empleando para conservarla hielo seco. Para la refrigeración es recomendable el empleo de recipientes con líquido refrigerante o hielo potable contenido en bolsas de plástico impermeables, para evitar que el agua de deshielo alcance la tapa de los envases o que de alguna manera contamine los alimentos muestreados.
- En el caso de muestras individuales blandas, evitar que la presión que puedan ejercer otros recipientes o una cantidad excesiva de las mismas las deformen u originen derrames y provoquen que el contenido se ponga en contacto con el exterior de la envoltura.
- En el caso de muestras no perecederas, evitar que se dañen, humedezcan o contaminen con otras.
- Los productos con presentación comercial deben ser transportados en sus envases originales a temperatura ambiente, siempre y cuando ésta no exceda de 45 °C.
- Para la conservación, durante el transporte de las muestras, no está permitido el empleo de sustancias químicas.

- Las muestras que se entreguen al laboratorio deberán acompañarse de un informe que además de contener la identificación de la muestra, incluya los siguientes datos:
  - ♦ Clave única que permita la identificación del domicilio del fabricante, representante y/o distribuidor.
  - ♦ Nombre genérico y específico del producto, así como la marca comercial y cualquier otra información que se considere importante.
  - ♦ Observaciones, en donde se señalen las condiciones sanitarias en el que se encontraban los productos antes de efectuar la toma de muestra, o algún otro dato que sea significativo para determinar los análisis microbiológicos que sean necesarios.
- La muestra testigo podrá eliminarse una vez que se obtengan resultados oficiales que indiquen el cumplimiento de las especificaciones sanitarias y el particular decida no llevar a cabo su impugnación.

## **RESULTADOS**

Se diseñarán las etiquetas y hoja de la toma de muestras, se tomarán las precauciones necesarias para el correcto llenado de estas formas, recolección, transporte y conservación de los alimentos, de acuerdo con todo lo indicado en este protocolo.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Andrews W.H. & Hammack T.S. (2003). *Bacteriological Analytical Manual Chapter 1. Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate*. 9<sup>th</sup> ed. Arlington, VA: AOAC. Recuperado el 5 de septiembre de 2016 de <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063335.htm>
- International Commission on Microbial Specifications of Foods (2005). *Microorganisms in Foods 6*. Chapman & Hall 2<sup>nd</sup> ed.
- Secretaría de Salud. Proyecto-NOM-109-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.



# 2 Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico

---

## **OBJETIVOS**

- Preparar adecuadamente muestras de alimentos, así como las diluciones que permitan investigar su contenido microbiológico.
- Determinar el número de diluciones adecuado, con base en las características y datos de la muestra y de los microorganismos que serán analizados.

## **GENERALIDADES**

Los microorganismos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, por lo que siempre se encuentran presentes en diversos productos, en especial en aquellos que favorecen de algún modo su sobrevivencia o desarrollo.

Los alimentos, por su producción primaria, generalmente tienen una importante microbiota “normal”, según la región y condiciones en que se producen; además, su composición tiende a conservar dicha flora y, por supuesto, le proporciona nutrientes de manera que, si las condiciones lo permiten, los microorganismos pueden multiplicarse en los alimentos. Como consecuencia de este desarrollo microbiano, los alimentos pueden deteriorarse y perder sus atributos.

Además de la microbiota normal, los alimentos son susceptibles de contaminación durante su manejo, ya sea por operadores, equipo, fauna nociva o por contaminación cruzada; algunos de los microorganismos contaminantes pueden ser patógenos y, en tal caso, su desarrollo e incluso su mera sobrevivencia pueden ocasionar desde el incumplimiento de normas de higiene y seguridad, hasta la aparición de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).

Dado el tamaño de las poblaciones microbianas que pueden estar presentes en un alimento, que van desde algunos miles hasta varios millones de células por gramo, su determinación cuantitativa requiere la preparación de diluciones conocidas

de la muestra; y es costumbre utilizar cifras decimales para facilitar los cálculos. En este método se establece la forma general de preparar dichas diluciones que se realiza como primera etapa en el análisis microbiológico de alimentos en las que se determina cuantitativamente algún microorganismo o grupo microbiano.

En vista de la gran cantidad de productos alimenticios y de la diversidad de sus características, algunos pueden requerir modificaciones o métodos específicos pero, en todos los casos donde sea posible, se recomienda apegarse a esta guía y modificarla únicamente cuando sea necesario.

Lo más adecuado es preparar una dilución primaria y, a partir de ella, todas las necesarias para poder contar los microorganismos presentes; pueden ser dos diluciones decimales consecutivas, es decir, 1:10 y 1:100 o superiores, según la carga microbiana esperada en el alimento. Un analista experimentado puede estimar el número de diluciones necesarias con el conocimiento que tenga del proveedor y del proceso, e incluso a partir de los datos de muestreo y, desde luego, de la experiencia con cada tipo de muestra.

Los diluyentes más utilizados son la solución amortiguadora de fosfatos, el agua peptonada y la solución salina isotónica, pero pueden utilizarse otros diluyentes que cumplan con las funciones de dispersar y homogenizar la carga microbiana y de facilitar la recuperación de los microorganismos en estudio, mediante condiciones de osmolaridad, pH, entre otros, que sean adecuadas para ellos; por ejemplo, para la determinación de *Vibrio cholerae*, que es alcalófilo, se utiliza agua peptonada a pH 8.5.

El buen resultado del método requiere que las fuentes de variación sean eliminadas en lo posible, por lo que es muy importante apegarse a la técnica y controlar cuidadosamente las condiciones.

## **FUNDAMENTO**

Posterior a la toma de muestra y como parte del análisis microbiológico, se realiza una dilución primaria, cuya finalidad es lograr obtener una muestra representativa del alimento en solución, esto es, tanto en el aspecto cualitativo (diferentes tipos de bacterias) como en el cuantitativo y así lograr una distribución, lo más uniforme posible, de los microorganismos contenidos en la muestra destinada al análisis. Por lo que el fundamento de este método es utilizar un diluyente que favorezca la recuperación de los microorganismos viables presentes, para ponerlos de manifiesto cuando se cultiven; para lograrlo, el diluyente debe tener la osmolaridad y el

pH favorables para iniciar la recuperación y actividad de las células microbianas, así como para favorecer aquellas que se buscan entre una población mixta.

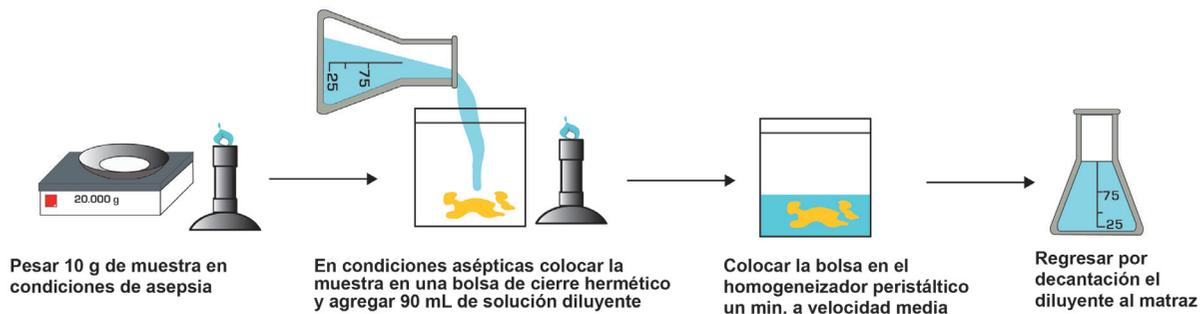
Se pretende encontrar el número de microorganismos por unidad de volumen, hasta asegurar que después de la incubación se obtenga un resultado cuantificable, esto se logra después de realizar tantas diluciones decimales seriadas como sea necesario, en el mismo diluyente. Este resultado puede ser la cuenta de colonias en placas (UFC/caja) o la observación de resultados proporcionales al tamaño de la población, en el caso de tubos o matraces.

### ***MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES***

- 1 matraz Erlenmeyer de 250 mL de capacidad, con 90.0 mL de solución amortiguadora de fosfatos o agua peptonada al 0.1%, o con solución salina isotónica (SSI), al 0.85%.
- 4 a 6 tubos de ensayo conteniendo 9.0 mL de solución amortiguadora de fosfatos o agua peptonada al 0.1% o con solución salina isotónica (SSI), al 0.85%.

### ***MATERIAL Y EQUIPO***

- Utensilios estériles (cuchillo, tenedor, cuchara, pinzas) para tomar la muestra.
- Pipetas graduadas de vidrio estériles de 10 mL, con algodón en el extremo superior (las necesarias de acuerdo con el número de diluciones).
- Propipetas.
- Pipetas graduadas de vidrio estériles de 1 mL, con algodón en el extremo superior (las necesarias de acuerdo con el número de diluciones) o puntas estériles para micropipeta de 1 mL, caja estéril para puntas y micropipeta de 0.1 a 1 mL.
- Stomacher® (homogeneizador peristáltico) o motor de licuadora con vaso esterilizado.
- 2 bolsas de plástico estériles para Stomacher® de calibre grueso de 30 X 40 cm.
- Mecheros de Bunsen.
- Balanza con precisión de 0.1 g.
- Baño de agua entre 40 y 45 °C, para muestras congeladas que originalmente son líquidas o licuables.



A partir del matraz que contiene la muestra homogeneizada realizar diluciones decimales seriadas, empleando para ello tubos con 9.0 mL de solución diluyente

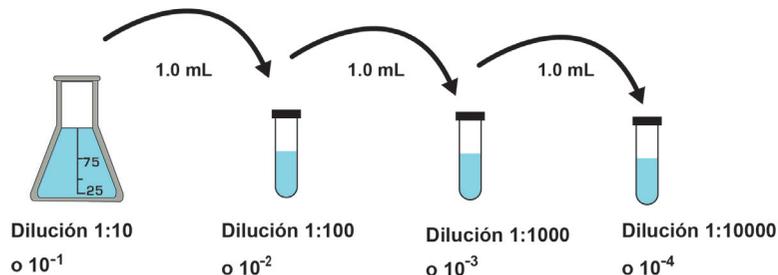


Figura 2.1 Preparación y dilución de muestras para su análisis microbiológico.

## **PROCEDIMIENTO**

### **1. Preparación de la dilución primaria**

**1.1. Muestras líquidas no viscosas** (como agua, leche, refrescos, entre otros; en las cuales la distribución de microorganismos es homogénea o fáciles de homogeneizar por medios mecánicos como agitación). Cuando se trabaja con alimentos líquidos, fácil homogenizables, que pueden distribuirse con pipetas de 1 mL, y con bajo contenido microbiano, puede omitirse la preparación de diluciones, pero este caso es una excepción, no la regla.

- Agitar la muestra manualmente en un arco de 30 cm, con 25 movimientos de arriba abajo, efectuados en un tiempo de 7 segundos.
- En condiciones asépticas, tomar con pipeta graduada de vidrio estéril 10.0 mL de la muestra.
- Colocar en el matraz Erlenmeyer que contiene 90.0 mL del diluyente, el cual debe encontrarse a una temperatura similar a ésta, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente.
- Cuando se trabaja con alimentos líquidos, fácilmente homogenizables, que pueden distribuirse con pipetas de 1 mL y con bajo contenido microbiano, es posible omitir la preparación de diluciones, pero este caso es una excepción, no la regla.

#### **1.1.1. Muestras congeladas que originalmente son líquidas o licuables**

- Fundir por completo la muestra en un baño de agua entre 40 y 45 °C, en un tiempo máximo de 15 minutos, y homogenizar agitando vigorosamente.
- Proseguir como se indica en el punto 1.1, para muestras líquidas no viscosas.

#### **1.1.2. Parte líquida de una muestra heterogénea que sea considerada suficientemente representativa de la muestra total**

- Proseguir como se indica en el punto 1.1., para muestras líquidas no viscosas.

### **1.2. Muestras sólidas o semisólidas**

#### **1.2.1. Muestras sólidas y semisólidas no congeladas**

- Pesar una cantidad de 10.0 g de la muestra en una bolsa plástica estéril.
- Adicionar los 90.0 mL del diluyente, contenidos en el matraz Erlenmeyer de 250 mL, de esta manera se obtiene una dilución 1:10, llevado a una temperatura similar a la de la muestra.

- Homogenizar en el Stomacher®, durante 1 min, hasta obtener una suspensión completa y homogénea, según se indique en la técnica correspondiente para cada alimento. Aún en los equipos más lentos, el tiempo de homogenización debe ser < 2.5 minutos. El homogeneizador peristáltico (Stomacher®) puede ser inadecuado para algunos productos, por ejemplo, aquellos con partículas agudas o constituyentes que no se dispersen fácil; sólo debe utilizarse cuando exista evidencia (publicada o por ensayos comparativos) de que los resultados obtenidos no difieren significativamente con aquellos obtenidos con licuadora.
- Permitir que las partículas grandes se sedimenten y transferir la suspensión al matraz Erlenmeyer, tomando ésta de las capas superiores de la suspensión. Cuando la dilución primaria es muy viscosa o pegajosa, adicionar más diluyente, el cual debe de registrarse y tomarse en cuenta para los cálculos y expresión de resultados.

### **1.3. Muestras sólidas y semisólidas congeladas**

- Descongelar en refrigeración de 4 a 8 °C durante 18 h y no más de 24 h antes de diluir y analizar.
- Proseguir como se indica en el punto 1.2.1., para muestras sólidas y semisólidas no congeladas.

### **NOTA**

En todos los casos, si la cantidad disponible de muestra no permite tomar 10 mL o 10 g, la dilución primaria puede hacerse con 1.0 mL de muestra en 9.0 mL de diluyente. Después se prosigue como se indica para las diluciones adicionales.

## **2. Preparación de las diluciones decimales adicionales**

Una vez que se obtiene la suspensión del diluyente con el alimento, se procede a realizar las diluciones decimales adicionales, de la manera siguiente:

- Transferir 1.0 mL o un múltiplo de la dilución primaria, a otro recipiente que contenga nueve volúmenes del diluyente estéril a la temperatura apropiada, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente. Si se toma 1.0 mL de muestra en 9.0 mL de diluyente, se obtendrá una dilución 1:10; si se utilizan 10.0 mL de muestra se utilizarán 90.0 mL de diluyente y así se tendrá la misma dilución 1:10, pero 1:100, con respecto a la muestra original.

- Mezclar cuidadosamente cada nueva dilución, siempre de la misma manera que se describe en el punto 1.1.
- La selección de las diluciones a preparar, así como de aquellas que se van a inocular, depende del número esperado de microorganismos en la muestra, con base en los resultados de análisis previos y de la información que se obtenga del personal de inspección que la haya colectado. En ausencia total de información, trabajar con las diluciones de la primera a la sexta (1:1000000 o  $10^{-6}$ ).
- Utilizar pipetas diferentes para cada dilución inoculando simultáneamente, ya sea en las cajas de Petri, tubos, matraces, placas *Petrifilm*, entre otros. El volumen transferido debe ser > 10% de la capacidad total de la pipeta. Si es terminal y se transfiere su capacidad total, escurrir aplicando la punta una sola vez en un área del dispositivo a inocular seleccionada.
- Mientras se afora el líquido de la pipeta, la punta de ésta debe apoyarse en el interior del cuello del frasco y mantenerla en posición vertical, para lo cual este último debe inclinarse lo necesario.

## **NOTAS**

- El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente, hasta que finalmente se inocula (ya sea en cajas de Petri, tubos, matraces u otro dispositivo que contenga un medio de cultivo para el desarrollo de los microorganismos viables), no debe exceder de 20 minutos.
- En estudios donde se busca la presencia o ausencia de una determinada especie de microorganismos en 0.1 mL o 0.1 g, no es necesario preparar diluciones mayores.

## **INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

En todos los casos, deben prepararse las diluciones que permitan obtener resultados dentro del intervalo de lectura, por lo menos en una de tres diluciones; como el rango de sensibilidad del método generalmente va de  $n$  a  $10n$  (de 15 a 150 o de 25 a 250 colonias, por ejemplo), el obtener resultados dentro del rango en dos diluciones subsecuentes se considera evidencia de que se ha logrado la distribución uniforme y se han controlado los factores de variación.

El **Cuadro 2.1** señala los límites de cuantificación, estadísticamente confiables, de algunos microorganismos importantes en microbiología de alimentos, de acuerdo con cada norma oficial mexicana.

**CUADRO 2.1** Límites de cuantificación estadísticamente confiables de algunos microorganismos importantes.

Método	Intervalo de lectura
Cuenta en placa de bacterias termofílicas, mesofílicas, psicofílicas y psicrotróficas	25 a 250 colonias / placa
Coliformes totales en placa	15 a 150 colonias / placa
Hongos y levaduras	10 a 150 colonias / placa
<i>Staphylococcus aureus</i> en placas extendidas en agar Baird Parker	15 a 150 colonias / placa
Cuenta en placa de bacterias esporuladas, totales o termorresistentes en placas vertidas	30 a 300 colonias / placa
<i>Clostridium perfringens</i> en placas extendidas con agar TSC y yema de huevo	20 a 200 colonias / placa
Bacterias del yogurt	10 a 300 colonias / placa

## RESULTADOS

Este ejercicio experimental es la base de los métodos cuantitativos y cualitativos, pero en esta etapa no se contempla la obtención de resultados numéricos. Siempre se deberán considerar todas las especificaciones planteadas para obtener resultados confiables en los análisis realizados.

Después de efectuar el análisis en cuestión, aplicar el factor de dilución; por tratarse de diluciones decimales, el factor es el inverso de la dilución. Es decir, que si los resultados estadísticamente confiables se obtuvieron en la dilución  $10^{-3}$ , el factor de dilución es  $10^3$ . Si se usó otra proporción en las diluciones, el inverso de la proporción en que se diluyó será el factor de dilución.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Secretaría de Salud (1994). Norma Oficial Mexicana. NOM-092-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de Bacterias Aerobias en Placa. Norma Oficial Mexicana. México.
- Secretaría de Salud (1994). NOM-110-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico. Norma Oficial Mexicana. México.
- Secretaría de Salud (1995). Norma Oficial Mexicana. NOM-111-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Norma Oficial Mexicana. México.
- Secretaría de Salud (2014). Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y Servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. México.
- International Commission on Microbial Specifications of Foods (2005). *Microorganisms in Foods 6*. Chapman & Hall 2<sup>nd</sup> ed.
- Swanson K.M., Petran R.L., Hanlin J.H. (2001). "Culture Methods for Enumeration of Microorganisms". In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington. Downs F.P. & Ito K. (Eds.) APHA.
- Andrews W.H. & Hammack T.S. (2003). *Bacteriological Analytical Manual. Chapter 1 Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate*. Recuperado el 5 de abril de 2016 de <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063335>



# 3 **Determinación de microorganismos indicadores**

---

## **OBJETIVOS**

- Realizar adecuadamente la técnica de cuenta en placa para diversos grupos microbianos indicadores de importancia en alimentos.
- Interpretar adecuadamente los resultados de la cuenta en placa para cada grupo indicador, así como las implicaciones en la calidad del alimento.

## **GENERALIDADES**

La microbiota presente en los alimentos desde su producción primaria, generalmente, está bien adaptada a ese ambiente y puede aprovechar los nutrientes y condiciones existentes para multiplicarse. Este incremento de la población microbiana puede tener consecuencias como el deterioro del alimento o, lo que es aún más importante, riesgos para la salud del consumidor. Además, los alimentos son susceptibles de contaminación durante su manejo; entre dichos contaminantes puede haber microorganismos patógenos y, en tal caso, su desarrollo e incluso su mera supervivencia pueden ocasionar desde el incumplimiento de normas de higiene y seguridad, hasta la aparición de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Por eso es tan importante el control microbiológico de materias primas, procesos y productos en la industria de alimentos.

Dicho control se lleva a cabo a través de análisis. Pero los análisis para determinar la presencia y cantidad de los microorganismos patógenos generalmente son largos y costosos. Además, su recuperación a través del análisis puede ser poco eficiente, por lo que tendremos falsos negativos, que son muy peligrosos, si consideramos que una vez que el patógeno entra a un organismo humano, tiene alta probabilidad de causar enfermedad.

Los patógenos que pueden transmitirse a través de un alimento son varios y la investigación de todos ellos es impracticable en el control rutinario. La determinación de patógenos en alimentos, aunque importante para el control del proceso,

tiene muchas dificultades. Ante esta problemática, se utilizan los microorganismos “indicadores”, que no implican en sí mismos un riesgo para la salud ni son los principales responsables del deterioro de los productos, pero “indican”, advierten oportunamente, a través de su presencia y/o número, de contaminación o condiciones que favorecen a microorganismos patógenos y causantes de deterioro.

Las características que debe reunir un grupo microbiano o un microorganismo, para ser un buen indicador, son las siguientes:

- Estar siempre presentes en la fuente de contaminación y no llegar al alimento por otras vías, por ejemplo, los coliformes fecales sólo llegan por contaminación con heces que son el origen principal de patógenos intestinales.
- Tener requerimientos nutricios similares a las de los microorganismos objetables; los indicadores generalmente son heterótrofos, mesófilicos, como los patógenos más importantes.
- Ser siempre afectados por las condiciones de manejo del alimento; por ejemplo, las bacterias mesófilicas aerobias son inhibidas por temperaturas de refrigeración, pero siempre se multiplican fuera de ese rango en forma proporcional al incremento de temperatura; siempre disminuyen por efecto de tratamientos térmicos adecuados, como la pasteurización.
- Estar en mayor (o al menos similar) cantidad respecto a los microorganismos objetables; por ejemplo, en materia fecal siempre habrá más coliformes que *Salmonella* o *Vibrio*; esto da un margen de seguridad al detectar indicadores en vez de patógenos. Además deben sobrevivir más que los microorganismos objetables en la matriz y condiciones del caso.
- Ser más fácilmente detectables que los microorganismos objetables, es decir, que el análisis sea más rápido, eficiente y económico, y que la diferenciación del resto de la microbiota sea clara y fácil.

Desde luego, no hay un indicador ideal para todos los alimentos, pues su origen, composición y condiciones son diferentes. La elección de un buen indicador o de una buena combinación de indicadores es muy importante para llevar a cabo el control de la calidad microbiológica y de la inocuidad de los alimentos. Actualmente, hay también muchos métodos listos para usarse y/o rápidos para la determinación de indicadores, que se prevé seguirán siendo los más importantes en la evaluación de higiene y en el control rutinario.

Entre los microorganismos indicadores en alimentos, destacan los señalados en el **Cuadro 3.1**.

**CUADRO 3.1** Utilidad de los principales microorganismos indicadores.

<b>Microorganismo o grupo</b>	<b>Indican</b>
Bacterias mesófilicas aerobias o cuenta estándar o cuenta de viables	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Exposición del alimento a condiciones que favorecen la multiplicación de la microbiota, como temperatura.</li> <li>▪ Eficiencia de tratamientos antimicrobianos.</li> <li>▪ Buena estimación de población de bacterias aerobias (y facultativas) vivas.</li> </ul>
Coliformes totales	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Prácticas higiénicas deficientes.</li> <li>▪ Calidad microbiológica deficiente.</li> <li>▪ Tratamientos de desinfección insuficientes o inadecuados.</li> </ul>
Coliformes fecales y/o <i>E. coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Presencia de materia fecal, pésimas prácticas de higiene o procesos inadecuados.</li> <li>▪ Tendencia actual a determinar sólo <i>E.coli</i>.</li> </ul>
Mohos y levaduras	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Exposición del alimento a condiciones que los favorecen, especialmente indica control inadecuado de Aw en alimentos que dependen de bajos valores de ésta para su conservación.</li> <li>▪ Contaminación general por exposición a condiciones ambientales.</li> </ul>

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Ahmed L.I., Morgan S.D., Hafez R.S. & Abdel-All A.A.A. (2014). Hygienic Quality of some Fermented Milk Products. *Int. Journ.of Dairy Sci.* 9, 3:63-73. DOI: [10.3923/ijds.2014.63.73](https://doi.org/10.3923/ijds.2014.63.73)
- Ashbolt N., Grabow W. & Snoozi M. (2001). Ch 13. Indicators of Microbial Water quality. En *Water quality - Guidelines, standards and health: Assessment of risk and risk management for water-related infectious disease*. Fewtrell & Bartram (Eds.). WHO, IWA Pub. UK
- Beuchat L.R. & Cousin M.A. (2001). Yeasts and Molds. In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4<sup>th</sup> ed. Downs F.P. & Ito K. (Eds.) APHA. Washington. 209-215.
- Bibek R. & Bhunia A. (2014). *Fundamental Food Microbiology*, 5<sup>th</sup> ed. CRC Press, USA.

- Cornell University (2015). *Mycotoxins*. Department of Animal Science. College of Agriculture and Life Sciences. Recuperado el 5 de septiembre de 2016 de <http://poisonousplants.ansci.cornell.edu/toxicagents/mycotoxin.html>.
- FDA (2015). Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce: Chapter VII. *The Use of Indicators and Surrogate microorganisms for the Evaluation of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce*. U.S. Food & Drug Administration. Recuperado el 5 de septiembre de 2016 de <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm091372.htm>  
<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071435.htm>
- ICMSF (2005). *Microorganisms in Foods 6*. Chapman & Hall. 2<sup>nd</sup> ed. International Commission on Microbiological Specifications of Foods.
- ICMSF. (2005). *Microorganisms in Foods 6*. 2<sup>nd</sup> ed. International Commission on Microbial Specifications of Foods. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. Recuperado el 5 de septiembre de 2016 de <http://link.springer.com/book/10.1007%2F0-387-28801-5>.
- Köppen R., Koch M., Siegel D., Merkel S., Maul R. & Nehl I. (2010). Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 86:1595-1612. DOI: 10.1007/s00253-010-2535-1
- Maturin L. & Peeler J.T. (2001). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 3: *Aerobic Plate Count*. U.S. Food and Drug Administration. Recuperado el 5 de septiembre de 2016 de <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm>.
- Parada N.R. (2014). Micotoxicosis del Ganado. *Toxicología Clínica Veterinaria*. Tardis. Chile. Recuperado el 5 de septiembre de 2016 de <http://www.ropana.cl/Toxivet/Micotoxinas.htm>
- Pierson M. & Smoot L. (2001) Indicator Microorganisms and Microbiological Criteria. In: *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. 2<sup>nd</sup> ed. Doyle M. Beuchat L. & Montville T. (Eds.) ASM Press. USA. 71-87.
- Secretaría de Salud (1995). Norma Oficial Mexicana. NOM-111-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- Secretaría de Salud. NOM-092-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de Bacterias Aerobias en Placa. Norma Oficial Mexicana. México.
- Secretaría de Salud. NOM-109-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Procedimiento para la Toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico. Norma Oficial Mexicana. México.
- Secretaría de Salud. NOM-110-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico. Norma Oficial Mexicana. México.
- Swanson K.M., Petran R.L. & Hanlin J.H. (2001). *Culture Methods for Enumeration of Microorganisms*. In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4<sup>th</sup> ed. Downs F.P. & Ito K. (Eds.) APHA. Washington. 53-67.
- Tournas V., Stack M.E., Mislivec P.B., Koch H.A. & Bandler R. (2001). Bacteriological Analytical Manual Chapter 18. *Yeasts, Molds and Mycotoxins*. U.S. Food and Drug Administration. Recuperado el 5 de septiembre de 2016.

# 4 **Determinación de bacterias mesofílicas aerobias**

---

## **OBJETIVOS**

- Explicar el fundamento de la cuenta en placa.
- Realizar adecuadamente la técnica de cuenta en placa para los principales grupos microbianos de importancia en alimentos.
- Interpretar adecuadamente los resultados de la cuenta en placa y sus implicaciones en la calidad del alimento.

## **GENERALIDADES**

Cuando se requiere investigar el contenido de microorganismos viables en un alimento, la técnica comúnmente utilizada es la cuenta en placa. Esta técnica no pretende detectar a todos los microorganismos presentes, pero el medio de cultivo, las condiciones de temperatura y aerobiosis permiten seleccionar grupos de bacterias cuya presencia es importante en diferentes alimentos; por ejemplo, las bacterias mesofílicas aerobias o mesófilos aerobios son un indicador general de la población que puede estar presente en una muestra y, por lo tanto, de la higiene con que ha sido manejado el producto y/o de la oportunidad que han tenido para crecer, por las temperaturas en que se ha mantenido la muestra.

Este grupo en particular se determina en la mayor parte de los alimentos, pero para algunos productos también es importante determinar la presencia de bacterias termofílicas, psicofílicas y psicrotróficas para predecir la estabilidad del producto bajo diferentes condiciones de almacenamiento. La técnica básica es la misma, pero cambian las condiciones de incubación, medios de cultivo y algunos otros detalles, que se mencionan en la técnica. Si se modifican las condiciones de incubación o se somete la muestra a algún tratamiento previo, el método puede aplicarse también a la detección de otros grupos como anaerobios o esporulados, desde luego, con la adecuada selección de medios de cultivo y condiciones de incubación.

El método permite numerosas fuentes de variación, algunas de ellas controlables, pero sujetas a la influencia de diversos factores, por lo que es muy importante apearse a la técnica y controlar cuidadosamente las condiciones.

## **FUNDAMENTO**

El método de cuenta en placa se basa en contar las unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en un gramo o mililitro de muestra. Se considera que cada colonia que desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo (o de un agregado de microorganismos) presente(s) en la muestra bajo estudio e inmobilizado en el agar; ese microorganismo (o microorganismos) es capaz de formar la colonia, es decir, una UFC. Para que las colonias puedan contarse de manera confiable, se hacen las diluciones decimales necesarias de la muestra, antes de ponerla en el medio de cultivo; la técnica para realizar este procedimiento se describe en “Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico”.

Existen métodos detallados para la cuenta en placa de bacterias, propuestos por la Association of Official Analytical Chemists (AOAC), la American Public Health Association (APHA) y por la *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, por mencionar algunos. En México, la metodología de cuenta en placa, aplicada a mesófilos aerobios y a otros grupos, se encuentra descrita en la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. La NOM-210-SSA1-2014 no indica modificaciones para esta determinación.

## **NOTAS**

- El medio de cultivo no debe fundirse más de una vez y debe mantenerse en baño de agua regulado a 45 °C, durante el tiempo suficiente para que alcance esta temperatura, hasta su utilización.
- El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente, hasta que finalmente se adiciona el medio de cultivo a las cajas, no debe exceder de 20 minutos.

### **MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES**

- 1 matraz Erlenmeyer de 250 mL de capacidad, con 90 mL de solución amortiguadora de fosfatos o agua peptonada.<sup>a</sup>
- 4 a 6 tubos de ensayo, con 9 mL de solución amortiguadora de fosfatos o agua peptonada.<sup>a</sup>
- 7 a 13 tubos con 20 mL c/u (o un matraz con 130 o 250 mL) de agar triptona-glucosa-extracto de levadura (ATGEL o agar para cuenta estándar) fundido y mantenido en baño de agua a  $45 \pm 1.0$  °C (para técnica de vertido en placa).<sup>a</sup>
- 6 a 12 cajas de Petri con 20 mL c/u, de agar triptona-glucosa-extracto de levadura (ATGEL o agar para cuenta estándar) (para técnica de extensión en superficie).<sup>a</sup>

### **MATERIAL Y EQUIPO**

- Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de  $\pm 1.0$  °C, provista con termómetro calibrado.<sup>a</sup>
- Contador de colonias de campo oscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador.<sup>b</sup>
- Registrador mecánico o electrónico.<sup>b</sup>
- Microscopio óptico.<sup>b</sup>
- Baño de agua con termómetro, que mantenga la temperatura a  $45 \pm 1.0$  °C.<sup>a</sup>
- Utensilios estériles (cuchillo, tenedor, cuchara, pinzas) para tomar muestra.<sup>a</sup>
- Pipetas automáticas de 1000  $\mu$ L y puntas estériles.<sup>a</sup>
- Pipetas bacteriológicas de 10 mL estériles, con filtro de algodón.<sup>a</sup>
- 7 a 13 cajas de Petri desechables estériles.<sup>a</sup>
- Stomacher® (homogeneizador peristáltico)<sup>a</sup> y bolsas estériles para Stomacher®.<sup>a</sup>

### **NOTAS**

<sup>a</sup> Material necesario al inicio de la práctica.

<sup>b</sup> Material necesario a las 24 y 48 horas de iniciada la práctica.

## **PROCEDIMIENTO**

- Pesar la muestra y preparar las diluciones como lo establece la técnica de “Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico”.

### **Técnica de vertido en placa**

- Distribuir las cajas estériles en la mesa de trabajo de manera que la inoculación y la adición de medio de cultivo se puedan realizar cómoda y libremente. Marcar las bases de las cajas con los datos pertinentes antes de inocular.
- Inocular por duplicado, 1 mL de la dilución correspondiente en cada caja, mediante pipeta automática con punta estéril. Agregar de 18 a 20 mL del medio fundido y mantenido a 45 °C. Para homogenizar, mezclar mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr la completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el medio no moje la cubierta de las cajas. Dejar solidificar. El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente hasta que finalmente se adiciona el medio de cultivo a las cajas, no debe exceder de 20 minutos.
- Incluir una caja sin inóculo por cada lote de medio y diluyente, preparado como testigo de esterilidad.
- Incubar las cajas en posición invertida durante el tiempo y a la temperatura que se requiera, según el tipo de alimento y microorganismo de que se trate, como se indica en la **Tabla 4.1**.

Aunque la NOM-092-SSA1-1994 que establece el método para esta determinación no considera variantes, es importante establecer que cuando se determinan microorganismos psicrófilos y psicrótrofos, el vertido de agar fundido a 45 °C es inadecuado para la supervivencia de estos microorganismos. En ese caso se utilizan placas de ATGEL y se inoculan por duplicado, 0.1 mL de la dilución correspondiente en cada caja, mediante pipeta estéril. Para distribuir de manera homogénea, extender el inóculo utilizando una varilla de vidrio estéril (en forma de “L”) haciendo movimientos giratorios de manera perpendicular al medio de cultivo, hasta lograr la completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el inóculo se absorba antes de incubar (se recomienda un tiempo de espera aproximado de 10 minutos).

**TABLA 4.1** Condiciones de incubación para cuenta en placa de diferentes grupos.

Grupo bacteriano	Temperatura	Tiempo de incubación
Termofílicos	55 ± 2 °C	48 ± 2 h
Mesofílicos <sup>a</sup>	35 ± 2 °C	48 ± 2 h
Psicrotróficos	20 ± 2 °C	de 3 a 5 días
Psicrofílicos	5 ± 2 °C	de 7 a 10 días

<sup>a</sup>Mesófilos aerobios en agua se incuban durante 24 h.

Mesófilos aerobios en otros alimentos se incuban durante 48 h.

### Variaciones del método

Cuando es necesario utilizar el método de extensión en superficie, pero se esperan cuentas bajas, se pueden utilizar de 3 a 5 cajas de Petri con el medio de cultivo, y sembrar 1 mL de la muestra líquida (o de dilución  $10^{-1}$ ), repartiendo el volumen en las 3 (o 5) cajas, es decir, sembrando 0.3+0.3+0.4 mL (o 0.2 mL en cada una de las 5 cajas). Aplican todas las demás indicaciones para el análisis y la incubación.

Por supuesto, en los cálculos se considera que el volumen inoculado fue la décima parte de un mL; el resultado por g de alimento o por mL de alimento será 10 veces mayor.

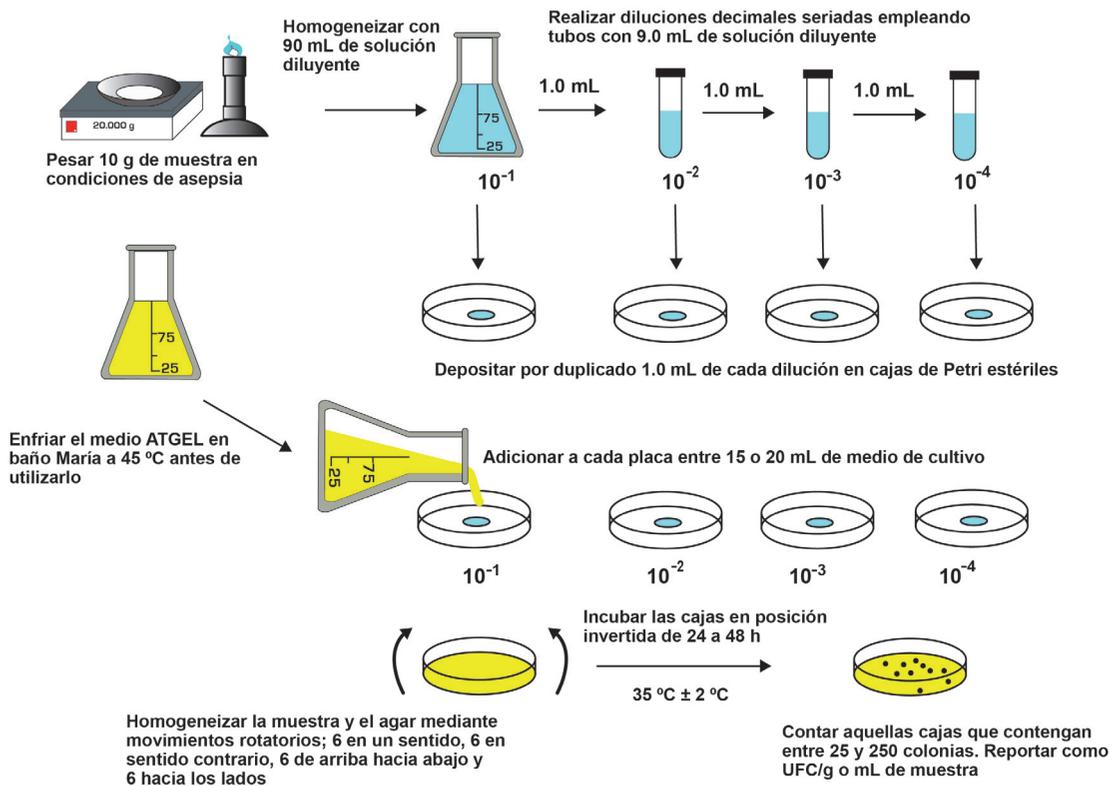


Figura 4.1 Determinación de bacterias mesófilas aerobias en alimentos.

## **RESULTADOS**

La selección de las cajas que se toman en cuenta para los cálculos es muy importante para la confiabilidad de los resultados; a continuación se especifican las reglas generales para seleccionarlas, pero conviene enfatizar que la selección de cajas obedece a criterios:

- lógicos (elegir placas que tienen número de UFC en el intervalo de lectura),
- estadísticos (considerar los duplicados y el mayor número posible de datos) y
- funcionales (a falta de datos representativos o dentro del intervalo de lectura, tomar los mejores disponibles).

### **Las reglas para seleccionar las cajas para los cálculos son las siguientes:**

- Se consideran representativas las cajas que tienen un número de UFC en el intervalo de lectura entre 25 y 250 UFC.
- Una vez seleccionadas las cajas y hechos los promedios correspondientes, se aplica el factor de dilución, que es el inverso de la dilución, y se redondea el número a 2 cifras significativas (o dígitos) y potencias de 10.

Ejemplos:

- Promedio de 312 UFC, se debe reportar como  $31 \times 10^1$ .
- Promedio de 199 UFC en  $10^{-2}$  se reportará como  $20 \times 10^3$  UFC.
- Promedio de 237.5 UFC en  $10^{-3}$ , se reportará como  $24 \times 10^4$  UFC.
- Cuando las 2 placas de una dilución contienen un número de colonias características dentro del rango de sensibilidad del método, se promedian los números y se multiplica por el inverso de la dilución.
- Cuando hay una placa con crecimiento extendido, no se consideran ésta ni su duplicado.
- Cuando una de las 2 placas de una dilución es representativa y la otra no, se consideran ambas y se promedian.
- Cuando hay placas representativas en 2 diluciones subsecuentes, se promedian cada una con su duplicado (aunque el duplicado no lo sea), se aplica el factor de dilución a cada una y luego se promedia nuevamente.
- Si en las placas no hay colonias (o no son características del grupo en estudio), reportar el resultado como: menos de un (grupo) en  $10^{-x}$  (la más baja

utilizada), por ejemplo  $< 100 / \text{g}$  si la dilución más baja fue  $10^{-2}$  o  $< 1 / \text{mL}$  si la muestra se sembró directamente, sin diluciones.

- Si no hay placas representativas, pero hay alguna con un número menor de UFC, se consideran las de la menor dilución y se agrega “valor estimado”.
- Cuando el número de colonias por placa exceda de 250, contar las colonias en aquellas porciones de la placa que sean representativas de la distribución de colonias. Contar, por ejemplo, una cuarta parte o una mitad del área de la caja y multiplicar el valor obtenido por 4 o 2, respectivamente. Si solamente pueden contarse algunos cuadros, considerar que el fondo de una caja Petri de 100 mm de diámetro contiene 65 cuadros de la cuadrícula del contador.

**Agregar la leyenda “valor estimado”.**

- Se cuentan como una sola colonia:
  - ♦ Cadenas (o pequeños grupos) no separadas claramente entre sí, que parecen ser causadas por la desintegración de un cúmulo de bacterias y que están separadas de otras colonias o cadenas.
  - ♦ Colonias extendidas como película entre el fondo de la caja y el agar y que se diferencian claramente de otras.
  - ♦ Colonias como película en las orillas de la caja, sobre la superficie del agar.
- Se considera “crecimiento extendido” el que se presenta cuando las colonias abarcan más del 50% de la superficie de la caja, con o sin inhibición de crecimiento; en ese caso, y/o cuando la inhibición exceda el 25% de la superficie de la caja, se considera que las placas no son representativas y, por lo tanto, no se toman en cuenta.

El **Cuadro 4.1** ejemplifica la aplicación de estos lineamientos; consúltelo para seleccionar las cajas a considerar en los cálculos y para aplicar leyendas adicionales.

**CUADRO 4.1** Ejemplos para el cálculo de resultados de cuenta en placa, utilizando ensayos por duplicado (intervalo de lectura: 25 a 250 colonias). Las cifras y recuadros resaltados en negritas son las que se consideran adecuadas para realizar los cálculos.

Ejem.	Serie duplic.	Diluciones			Resultado UFC / g o mL	Observaciones
		10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>		
1	A	> 250	<b>178</b>	16	18 x 10 <sup>4</sup>	Si están dentro del rango, se promedian los datos de la dilución 10 <sup>-3</sup> (184 x 10 <sup>3</sup> se redondea a 18 x 10 <sup>4</sup> ). Las demás diluciones no están en el rango.
	B	> 250	<b>190</b>	17		
2	A	> 250	<b>220</b>	<b>25</b>	23 x 10 <sup>4</sup>	Se promedian datos de dilución 10 <sup>-3</sup> (= 179 x 10 <sup>3</sup> , pasa a 180 x 10 <sup>3</sup> o 18 x 10 <sup>4</sup> ). Además, se promedian datos de dilución 10 <sup>-4</sup> (= 27 x 10 <sup>4</sup> ). Finalmente, se promedian los resultados de ambas diluciones y se redondea el resultado final.
	B	> 250	<b>138</b>	<b>28</b>		
3	A	<b>18</b>	2	0	16 x 10 <sup>2</sup> valor estimado	Se promedian datos de diluc. 10 <sup>-2</sup> , aunque están fuera de rango, son los más cercanos. Se anota "valor estimado".
	B	<b>14</b>	0	0		
4	A	> 250	> 250	<b>512</b>	50 x 10 <sup>5</sup> valor estimado	Se toma la más alta que se pueda contar, aunque sea en cuadrantes o cuadrícula y se anota "valor estimado".
	B	> 250	> 250	<b>495</b>		
5	A	> 250	<b>240</b>	34 Crecim. extend.	24 x 10 <sup>4</sup>	Se ignora la dilución 10 <sup>-4</sup> por el crecimiento extendido; se promedian los datos de 10 <sup>-3</sup> , se redondea 237.5 a 240.
	B	> 250	<b>235</b>			
6	A	0	0	0	< 100 Sensibilidad del método	Se reporta como < 1 en la dilución más baja que se utilizó, en este caso 10 <sup>-2</sup> .
	B	0	0	0		
7	A	> 250	<b>240</b>	24	25 x 10 <sup>4</sup>	Se promedian el único dato que está dentro del rango (240), con su duplicado, aunque éste salga del rango (268).
	B	> 250	<b>268</b>	19		
8	A	> 250	<b>216</b>	<b>23</b>	29 x 10 <sup>4</sup>	Se consideran las placas que están dentro del rango (216 y 42) y se promedian con sus duplicados (262 y 23) aunque éstos salgan del rango. Finalmente, se promedian los resultados de ambas diluciones.
	B	> 250	<b>262</b>	<b>42</b>		
9	A	> 250	<b>215</b>	<b>20</b>	23 x 10 <sup>4</sup>	Se promedian datos de 10 <sup>-3</sup> , se promedian datos de 10 <sup>-4</sup> y se realizan los cálculos como en el ejemplo 2.
	B	> 250	<b>235</b>	<b>26</b>		

## **CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS**

Reportar como se indica a continuación, con dos cifras significativas y potencias de 10:

Bacterias mesofílicas aerobias en placa en agar triptona extracto de levadura, incubadas a  $35 \pm 1.0$  °C / \_\_\_\_ h: \_\_\_\_\_ UFC / g (o / mL) de muestra.

Sustituir “mesofílicas” por termofílicas, psicrófilicas o psicrotroficas, según corresponda, **anotando la temperatura y el tiempo de incubación correspondientes.**

**Si se analizó un alimento para el cual existe norma y existe especificación sobre el grupo estudiado, incluya en el reporte si el alimento cumple o no con la norma.**

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Ashbolt N., Grabow W. & Snoozi M. (2001). Ch 13. Indicators of Microbial Water quality. En *Water quality - Guidelines, standards and health: Assessment of risk and risk management for water-related infectious disease*. Fewtrell & Bartram (Eds.). WHO, IWA Pub. UK
- FDA (2015). Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce: Chapter VII. *The Use of Indicators and Surrogate microorganisms for the Evaluation of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce*. U.S. Food & Drug Administration. Recuperado el 5 de septiembre de 2016 de <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm091372.htm>
- ICMSF. (2005). *Microorganisms in Foods 6*. 2<sup>nd</sup> ed. International Commission on Microbial Specifications of Foods. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. Recuperado el 5 de septiembre de 2016 de <http://link.springer.com/book/10.1007%2F0-387-28801-5>.
- Maturin L. & Peeler J.T. (2001). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 3: *Aerobic Plate Count*. U.S. Food and Drug Administration. Recuperado el 5 de septiembre de 2016 de <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm>.

Secretaría de Salud. NOM-109-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Procedimiento para la Toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico. Norma Oficial Mexicana. México.

Secretaría de Salud. NOM-110-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico. Norma Oficial Mexicana. México.

Secretaría de Salud. NOM-092-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de Bacterias Aerobias en Placa. Norma Oficial Mexicana. México.

Swanson K.M., Petran R.L. & Hanlin J.H. (2001). *Culture Methods for Enumeration of Microorganisms*. In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4<sup>th</sup> ed. Downs F.P. & Ito K. (Eds.) APHA. Washington. 53-67.



# 5

## Determinación de coliformes totales por cuenta en placa

---

### OBJETIVOS

- Explicar el fundamento de la determinación de coliformes totales en un alimento, mediante la cuenta en placa.
- Realizar adecuadamente la determinación de coliformes totales en un alimento, mediante la cuenta en placa.
- Interpretar los resultados obtenidos, de acuerdo con las normas aplicables.

### GENERALIDADES

La definición, generalmente aceptada para el término *coliformes*, describe a estos microorganismos como bacilos Gram-negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos, que fermentan la **lactosa** con producción de ácido y gas.

Basado en que la presencia de *E.coli* es abundante en la materia fecal humana y animal, pero es rara en otros ambientes, Shardingger sugirió, en 1892, la utilización de *E. coli* como indicador de contaminación fecal. Su propuesta contaba, además, con que la identificación mediante la fermentación de lactosa era bastante sencilla. En la aplicación de su idea, la presencia de otros géneros como *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter* que también fermentan la lactosa, complicó su utilización como indicador de la posible presencia de patógenos en alimentos y agua. A partir de ese problema se acuñó el término “coliformes” para agrupar a las bacterias entéricas más comunes.

Otra dificultad en su utilización como indicadores es que los coliformes pueden estar naturalmente presentes en otros ambientes y muestras; se definió como coliformes termotolerantes a los fecales, por su habilidad para fermentar la lactosa a temperaturas de 44.5 a 45.5 °C, lo cual no logran los coliformes de origen no fecal. Sólo las cepas de *E. coli* y las *Klebsiella* de origen entérico son capaces de fermentar lactosa a esas temperaturas.

Conforme la ciencia nos ha proporcionado medios y métodos más prácticos, rápidos y confiables para la determinación de *E. coli*, esta especie ha resurgido como el indicador de contaminación fecal por excelencia; la tendencia en el mundo, es centrarse en la determinación de *E. coli* como indicador de contaminación fecal. Sin embargo, se siguen utilizando los coliformes totales como indicadores de calidad sanitaria y de la eficiencia de los procesos antimicrobianos.

*E. coli* se considera indicador de contaminación fecal reciente y de condiciones no-higiénicas.

A pesar de los avances en las formas de aislamiento e identificación, los coliformes siguen siendo un excelente indicador de calidad sanitaria en los alimentos y en el ambiente alimentario. Los análisis para detectar a estos indicadores se basan en la utilización de lactosa, combinada con indicadores. En este ejercicio se determinarán coliformes totales (sin importar si su origen es fecal o no), mediante cuenta en placa con medio de agar bilis rojo violeta (ABRV). El método también puede llevarse a cabo por filtración en membrana con placas listas como Petrifilm® y CompactDry®, cuyo fundamento y metodología se describe también en el presente documento.

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

- Evaluación del cumplimiento y la eficiencia de las prácticas sanitarias, en el manejo de los alimentos, del equipo y del hielo y agua empleados en su fabricación.
- Evaluación de la calidad microbiológica de un producto, aunque su presencia no necesariamente implica un riesgo sanitario, cuando los coliformes son de origen no-fecal.

## **FUNDAMENTO**

Los coliformes resisten la presencia de bilis en el medio de cultivo; cuando se desarrollan en ABRV, el ácido producido por la fermentación de la lactosa, ocasiona el vire del indicador rojo neutro y la precipitación de las sales biliares, por lo que las colonias son color rojo oscuro y generalmente están rodeadas de un halo de sales biliares precipitadas, de color rojo claro o rosa.

La posibilidad de contar las colonias se fundamenta en su dispersión y separación, como se explicó en la técnica de preparación de diluciones.

## **NOTAS**

Cuando se utiliza el medio ABRV para la cuenta en placa de coliformes, debe considerarse lo siguiente:

- Si el alimento contiene mono o disacáridos en altas concentraciones, éstos pueden ser fermentados por otro grupo de microorganismos, generando colonias semejantes a las de coliformes.
- El medio no debe esterilizarse ni sobrecalentarse, por lo que se debe utilizar antes de 3 h a partir de su preparación; en cuanto se disuelva el agar, se debe colocar en baño de agua a 45 °C para mantenerlo fundido, hasta el momento de utilizarlo.
- Debe ponerse una sobrecapa de medio una vez que las placas vertidas han solidificado, para favorecer las condiciones de microaerobiosis, más adecuadas para los coliformes.
- El sobrecalentamiento del medio y las variaciones en las condiciones de incubación, especialmente la incubación prolongada, pueden ocasionar la formación de colonias rojas de cocos Gram-positivos.
- El **intervalo de lectura** para tener confiabilidad estadística en el aspecto cuantitativo es de 15 a 150 UFC por placa.
- El tiempo transcurrido, desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente hasta que finalmente se vierten los medios de cultivo en las cajas con las muestras de diluciones, no debe exceder de 20 minutos.

## **MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES**

- 1 matraz Erlenmeyer de 250 mL con 90.0 mL de solución amortiguadora de fosfatos de pH  $7.0 \pm 0.2$  o agua peptonada.<sup>a</sup>
- 2 a 4 tubos de ensayo con 9.0 mL de solución amortiguadora de fosfatos de pH  $7.0 \pm 0.2$  o agua peptonada.<sup>a</sup>
- 6 a 10 tubos de ensayo, con 20.0 mL de ABRV c/u, (o un matraz Erlenmeyer con 125 a 210 mL).<sup>a</sup>
- 6 a 10 tubos de ensayo, con 5.0 mL de ABRV c/u, (o un matraz Erlenmeyer con 30 a 50 mL).<sup>a</sup>

## **MATERIAL Y EQUIPO**

- Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de  $\pm 1.0$  °C, provista con termómetro calibrado.<sup>a</sup>
- Balanza granataria.<sup>a</sup>
- Contador de colonias de campo oscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador.<sup>b</sup>
- Registrador mecánico o electrónico.<sup>b</sup>
- Microscopio óptico.<sup>b</sup>
- Baño de agua con termómetro calibrado, que mantenga la temperatura a  $45 \pm 1.0$  °C.<sup>a</sup>
- Utensilios estériles (cuchillo, tenedor, cuchara, pinzas) para tomar muestra.<sup>a</sup>
- Pipetas automáticas de 1.0 mL y puntas estériles.<sup>a</sup>
- Pipetas bacteriológicas de 1 mL, estériles, con algodón en el extremo superior.
- 5 a 9 cajas de Petri estériles, de 15 x 100 mm.<sup>a</sup>
- Stomacher® (homogeneizador peristáltico).<sup>a</sup>
- Bolsas estériles para Stomacher®.<sup>a</sup>

## **NOTAS**

<sup>a</sup> Material necesario al inicio de la práctica.

<sup>b</sup> Material necesario a las 24 y 48 horas de iniciada la práctica.

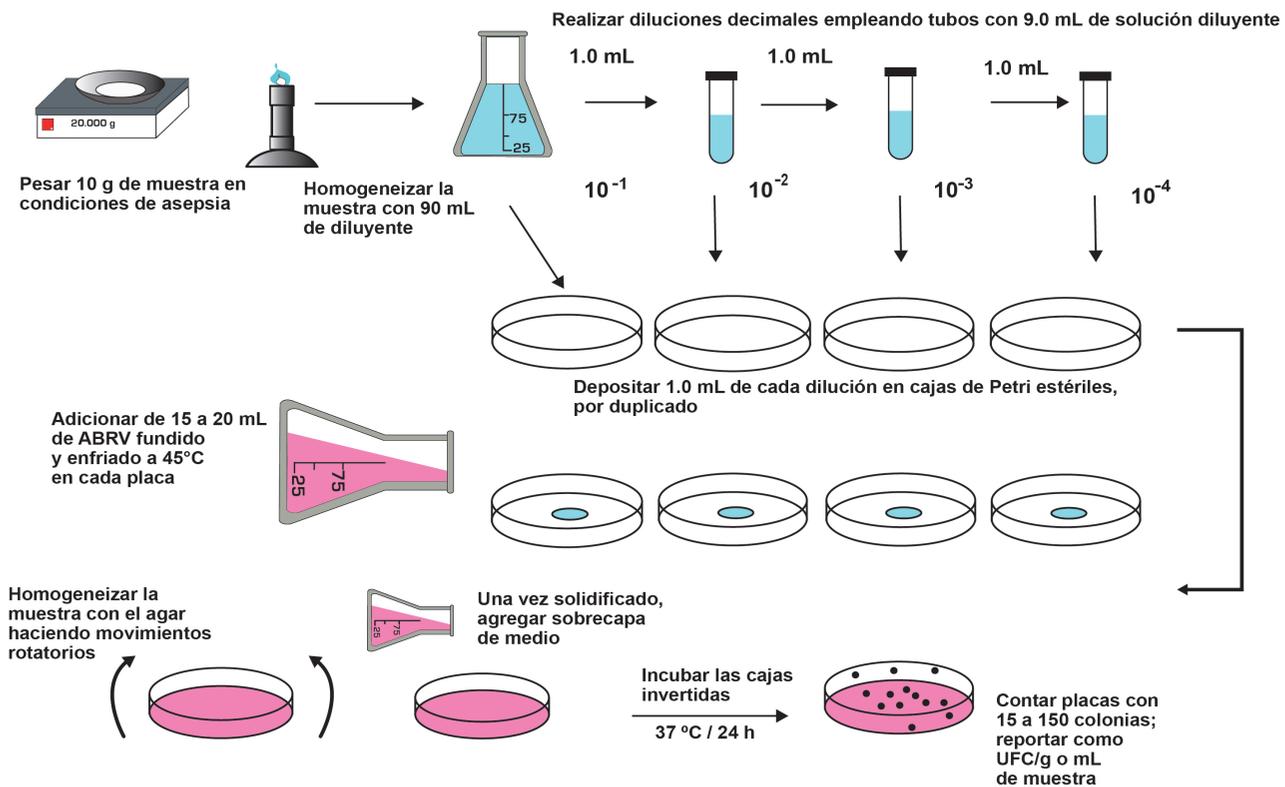


Figura 5.1 Determinación de coliformes totales por cuenta en placa.

## **PROCEDIMIENTO**

- Pesar la muestra y preparar las diluciones como lo establece la técnica de Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico. Recordar que el **intervalo de lectura** del método es de 15 a 150 colonias por placa.
- Distribuir las cajas estériles en la mesa de trabajo de manera que la inoculación y la adición de medio de cultivo se puedan realizar cómoda y libremente. Marcar las bases de las cajas con los datos pertinentes antes de colocar el inóculo.
- Inocular por duplicado, 1.0 mL de la dilución correspondiente en cada caja, mediante pipeta estéril y verter de 18 a 20 mL del medio ABRV fundido y mantenido a  $45 \pm 1.0$  °C en baño de agua. El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el momento en que se vierte el medio de cultivo, no debe exceder de 20 minutos.
- Mezclar cuidadosamente el inóculo con el medio, mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, 6 movimientos en el sentido contrario al de las manecillas del reloj y 6 de atrás para adelante, sobre una superficie lisa y nivelada. Permitir que la mezcla solidifique dejando las cajas de Petri sobre una superficie horizontal fría. No permitir que se mojen las tapas de las cajas.
- En cuanto el medio solidifique, agregar a cada caja una sobrecapa de 4 o 5 mL del mismo medio fundido y mantenido a 45 °C, no permitir que se mojen las tapas de las cajas. La sobrecapa de agar se coloca para favorecer el crecimiento de los coliformes, que son facultativos. Dejar que solidifique.
- Preparar una caja control con 18 a 20 mL de medio para verificar la esterilidad.
- Una vez solidificado el medio, invertir las placas y colocarlas en la incubadora a 35 °C, durante  $24 \pm 2$  h.
- Después de este periodo, contar las colonias con el contador de colonias. Seleccionar las placas que contengan entre 15 y 150 colonias. Las colonias típicas son de color rojo oscuro, generalmente se encuentran rodeadas de un halo de precipitación debido a las sales biliares, el cual es de color rojo claro o rosa, la morfología colonial es semejante a lentes biconvexos con un diámetro de 0.5 a 2.0 mm.
- Si hay desarrollo extendido o un número de colonias superior al del rango de sensibilidad del método, aplicar las reglas indicadas en el **inciso de RESULTADOS de la práctica de Determinación de bacterias mesofílicas**

**aerobias.** Hacer uso del microscopio para resolver los casos en los que no se pueden distinguir las colonias de las pequeñas partículas de alimento.

## **CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS**

Para seleccionar cajas y reportar, seguir las indicaciones de la práctica Determinación de bacterias mesofílicas aerobias.

Reportar como se indica a continuación, con dos cifras significativas y potencias de 10: Coliformes totales en placas de ABRV, incubadas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} / 24 \pm 2\text{ h}$ : \_\_\_\_\_ UFC / g (o / mL) de muestra.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Feng P., Weagant S.D., Grant M.A. & Burkhardt W. (2013). *Bacteriological Analytical Manual BAM Chapter 4: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria. Laboratory Methods*. U.S. Food and Drug Administration. Recuperado el 5 de septiembre de 2016 de <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm>.
- ICMSF. (2005). "Microorganisms in Foods 6". 2<sup>nd</sup> ed. International Commission on Microbial Specifications of Foods. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. Recuperado el 5 de septiembre de 2016 de <http://link.springer.com/book/10.1007%2F0-387-28801-5>.
- Kornacki J.L. & Johnson J.L. (2001). "Enterobacteriaceae, Coliforms, and Escherichia coli as Quality and Safety Indicators". In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4<sup>th</sup> ed. Downs F.P. & Ito K. (Eds.) APHA. Washington. 69-82.
- Secretaría de Salud. NOM-110-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico. Norma Oficial Mexicana. México.
- Secretaría de Salud. NOM-113-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Métodos para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Norma Oficial Mexicana. México.
- Secretaría de Salud. NOM-092-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa. Norma Oficial Mexicana. México.



# 6 **Determinación de mohos y levaduras en alimentos**

---

## **OBJETIVOS**

- Explicar el fundamento del método de detección y cuantificación de mohos y levaduras en alimentos.
- Realizar adecuadamente la cuenta en placa de mohos y levaduras presentes en alimentos destinados al consumo humano.
- Establecer la conformidad de alimentos susceptibles a contaminación con mohos y levaduras, tomando como referencia las NOM aplicables.

## **GENERALIDADES**

Los hongos y las levaduras se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, por lo que forman parte de la microbiota nativa de los alimentos, desde su origen; también pueden contaminarlos a partir de su presencia en el transporte, las plantas de proceso, almacenes o equipos mal sanitizados, entre otros.

Ciertas especies de hongos y levaduras son útiles en la elaboración de alimentos, pero por su adaptación a ambientes poco favorables y por sus poderosos sistemas enzimáticos, muchos de ellos son capaces de deteriorar los alimentos. Los mohos pueden atacar a los alimentos desde las zonas de producción primaria en el campo, generando daño y descomposición en todas las partes de los vegetales. También pueden afectarlos en el almacenamiento, ya que uno de los factores de control microbiano en esta etapa es la humedad y los mohos pueden crecer en condiciones de humedad muy baja. Además es muy fácil que, aun en almacenes con buen control de humedad, se generen microzonas favorables para los mohos por condensación, gradientes de temperatura y subsecuente migración de humedad, entre otras causas.

El recuento de mohos y levaduras se hace tradicionalmente en placas de medios adecuados para estos microorganismos, como papa-dextrosa-agar o agar-extracto

de malta; la selectividad de dichos medios se incrementa mediante  $\text{pH} < 4.5$  y/o con antibióticos u otros inhibidores bacterianos, como el colorante rosa de Bengala.

Los mohos y levaduras se consideran un grupo de microorganismos indicadores, por su facilidad para crecer en condiciones como bajo  $\text{pH}$  y baja  $A_w$ , que son algunas de las barreras utilizadas en la conservación de alimentos; y porque su presencia está advirtiendo oportunamente de otros riesgos importantes como:

- producción de micotoxinas,
- crecimiento posterior de patógenos gracias a que los mohos y levaduras eliminan barreras al consumir ácidos o hidrolizar moléculas que atrapan agua.

Finalmente, hay diversos reportes que establecen una correlación negativa entre la presencia de mohos y la calidad de los alimentos.

Respecto a las micotoxinas es importante señalar que pueden tener actividad genotóxica, mutagénica, carcinogénica o teratogénica, entre otras. Un grave problema es la estabilidad de estas moléculas; una vez que se producen, no se destruyen con calor ni con otros procesos alimentarios. Por el contrario, pueden acumularse en tejidos o fluidos animales, cuando éstos las ingieren en piensos, granos, ensilados, pastos y otros alimentos contaminados.

Algunas de las micotoxinas más importantes son:

- las aflatoxinas producidas por *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*;
- la ocratoxina A producida por *A. ochraceus*, *A. carbonarius* y *A. niger*;
- sterigmatocistina producida principalmente **por** *A. versicolor*;
- ácido ciclopiazónico producido por *A. flavus* y *A. tamarii*.

También son micotoxinas importantes: citrinina, patulina y ácido penicílico, producidas por especies de *Aspergillus*.

Las aflatoxinas son derivados de la difurancumarina. Las aflatoxinas  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  y  $G_2$  se producen en la naturaleza por los mohos ya mencionados. La aflatoxina  $B_1$  tal vez sea el carcinógeno de hígado más potente para animales, incluyendo el del humano. La ocratoxina A y la citrinina afectan la función renal. Las toxinas tremorgénicas (que inducen temblores, ataxia, vértigo o convulsiones) son producidas por los géneros *Penicillium* y *Claviceps*, afectan el sistema nervioso central en ganado y en humanos.

El término **moho** se aplica para designar a ciertos hongos filamentosos cuyo crecimiento en la superficie de los alimentos tiene un aspecto característico, aterciopelado o algodonoso, a veces pigmentado. Todo alimento enmohecido se

considera no apto para el consumo. La identificación y clasificación de los mohos se basa en observaciones macroscópicas y microscópicas.

**Hifas y micelio.** El talo de los mohos está formado por una masa de filamentos ramificados, llamados *hifas* y se denomina *micelio* al conjunto de las hifas. Las hifas pueden ser sumergidas o aéreas. También se pueden clasificar en hifas vegetativas o de crecimiento, las cuales se encargan de la nutrición del moho, y en hifas fértiles o de órganos reproductores. Las hifas pueden ser:

- septadas, es decir, provistas de paredes transversales que separan a las células, en estas hifas se observa un núcleo en cada espacio separado por pared celular.
- no septadas (o cenocíticas), que son las hifas sin paredes transversales; éstas poseen núcleos diseminados a lo largo del cilindro.

Además, algunas estructuras u organelos del micelio ayudan a identificar a los mohos; por ejemplo, los rizoides o “anclajes” de los géneros *Rhizopus* o *Absidia*, la célula basal del género *Aspergillus* y la ramificación dicotómica, o en forma de “Y” del género *Geotrichum*.

**Órganos o estructuras reproductoras.** Los mohos se reproducen principalmente por medio de esporas asexuales o sexuales. A estos últimos se les denomina “perfectos”.

A partir de sus estructuras de reproducción sexual, se dividen en:

- Hongos perfectos que pueden reproducirse por esporas sexuales (y asexuales)
  - Cenocíticos:
    - *Oomycetes*.
    - *Zygomycetes*.
  - Septados:
    - *Ascomycetes*.
    - *Basidiomycetes*.
- *Fungi Imperfecti*, los cuales sólo poseen esporas asexuales, que pueden ser:
  - Artrosporas u oidios, formados por fragmentación de la hifa.
  - Conidiosporas o esporas libres.
  - Esporangiosporas, contenidas en un esporangio.

Se denomina *conidióforo* o *esporangióforo* a la hifa que soporta la estructura reproductiva; en el caso de los conidióforos, se denomina *esterigma* o *fiálide* a la célula especializada de la cual nacen las conidias. El extremo engrosado del esporangióforo se denomina *columnela* y adopta formas típicas en cada especie.

**Propiedades fisiológicas.** En comparación con la mayoría de las levaduras y de las bacterias, los mohos necesitan menor actividad acuosa. Un porcentaje de humedad < 14-15% impide o retarda significativamente el crecimiento de los mohos. Los mohos pueden considerarse mesófilos, es decir, que son capaces de crecer bien a temperaturas normales, aunque la temperatura óptima de la mayoría de ellos se encuentra entre 25 y 30 °C. Hay hongos y levaduras psicrótrofos y algunos termófilos. Los mohos son aerobios estrictos, en tanto que las levaduras son facultativas. Casi todos los mohos son capaces de crecer dentro de un amplio intervalo de pH (2 a 8.5), aunque la mayoría crece mejor a pH ácido. Son capaces de utilizar muchos tipos de alimentos, que van desde sencillos a complejos. Poseen enzimas hidrolíticas, por ello algunos se utilizan para la producción industrial de las amilasas, pectinasas, proteasas y lipasas.

### Algunos géneros de *mohos* importantes en alimentos

***Mucor.*** Intervienen en la alteración de alimentos y se utilizan en la fabricación de otros. *M. rouxii* se utiliza para la sacarificación del almidón, para la maduración de quesos y para la fabricación de alimentos orientales.

***Rhizopus.*** La especie *R. stolonifer*, o moho del pan, es muy común e interviene en la alteración de algunos alimentos: bayas, frutas, hortalizas, pan, etc. Entre los útiles destaca *Rh. oligosporus* que produce el tempeh, alimento oriental de granos de soya.

***Aspergillus.*** Es un género abundante; algunas especies intervienen en el deterioro de alimentos, mientras que otros se utilizan para la producción industrial de ácidos cítrico y glucónico, y de algunas enzimas. *A. flavus* se utiliza para la fabricación de ciertos alimentos orientales y en la obtención de enzimas, aunque hay especies productoras de toxinas.

***Penicillium.*** Es otro género de mohos de frecuente incidencia y de importancia en los alimentos, *P. expansum* produce la podredumbre blanda de las frutas; *P. digitatum* y *P. italicum* producen la podredumbre de frutas cítricas. Las especies *P. camemberti*, *P. roqueforti* se utilizan en la maduración de quesos. Se han reportado más de 80 especies de *Penicillium* como productores de micotoxinas.

Se recomienda consultar la bibliografía para conocer otros géneros de mohos con importancia en los alimentos.

## Levaduras y hongos levaduriformes

El término *levadura* se refiere a aquellos hongos que no son filamentosos, sino unicelulares y de forma ovoide o esferoide, que se reproducen por gemación o por fisión y que son facultativos, a diferencia de los mohos. Cabe recordar que existen hongos dimórficos en este grupo, que alternan la morfología unicelular y la de hifas o filamentos, en función de condiciones ambientales y/o ciclos de vida.

Las levaduras se utilizan en la elaboración de alimentos como panes, cervezas, vinos, vinagres y quesos, también se utilizan en la obtención de enzimas y otros alimentos fermentados. Las levaduras son perjudiciales cuando producen la alteración del *sauerkraut* (chucrut), de los zumos de frutas, de los jarabes, de la melaza, de la miel, de las carnes, del vino, de la cerveza y de otros alimentos.

Los caracteres morfológicos microscópicos de las levaduras incluyen forma (que puede ser de esférica a ovoide, alimonada, piriforme, cilíndrica, triangular e incluso alargada) y zona de gemación, unas pocas especies se reproducen por fisión. En los cultivos en placas de agar es difícil diferenciar las colonias de levaduras de las colonias bacterianas; la observación microscópica de los microorganismos es la única forma segura de diferenciarlas. La mayoría de las colonias jóvenes de levaduras son húmedas, algo mucosas, blancuzcas, aunque algunas tienen un color crema o rosado; son oxidativas, fermentativas, o bien, su actividad metabólica es de ambos tipos a la vez.

La mayoría de las levaduras crecen mejor que la mayoría de las bacterias en ambientes que contienen elevadas concentraciones de solutos (por ejemplo carbohidratos o cloruro de sodio), es decir, son osmotolerantes. Sin embargo, la mayoría de las levaduras necesitan mayor humedad que los mohos. Para la mayoría de las levaduras la  $A_w$  mínima de crecimiento oscila entre 0.88 y 0.94. El intervalo de temperaturas de crecimiento es parecido al de los mohos, con una temperatura óptima en torno a los 25 o 30 °C y una temperatura máxima en torno a los 35 o 47 °C. Crecen mejor en aerobiosis, aunque son facultativas. Los azúcares son la fuente energética más apropiada para las levaduras, aunque las oxidativas también pueden oxidar los ácidos orgánicos y el alcohol.

Algunos géneros de importancia en alimentos son:

***Schizosaccharomyces***. Levaduras de este género se han encontrado en frutas tropicales, en la melaza y en la miel.

**Saccharomyces.** La especie *S. cerevisiae* se emplea en muchas industrias alimentarias, como en la fermentación del pan, de la cerveza, de los vinos, en la producción de alcohol, glicerol e invertasa.

**Kluveromyces.** *K. marxianus* (antes *Saccharomyces fragilis*) se utiliza en la obtención de productos lácteos por su capacidad de fermentar la lactosa.

**Zygosaccharomyces.** Género importante por su capacidad para crecer en medios con elevadas concentraciones de azúcar (osmófilas), intervienen en la alteración de miel, jarabes y melazas, y en la fermentación de la salsa de soya y de algunos vinos.

**Pichia.** Crecen en la superficie de los líquidos formando una película. *P. membranifaciens* produce una película en la superficie de las cervezas y vinos.

**Debaromyces.** Forman una película en la superficie de las salmueras. *D. kloec-keri* crece en la superficie de los quesos y de los embutidos.

**Hanseniaspora.** Estas levaduras tienen forma de limón y crecen en los zumos de frutas.

**Torulopsis.** Originan problemas en las fábricas de cervezas. *T. sphaerica* fermenta la lactosa, alterando productos lácteos. Otras especies alteran la leche condensada azucarada, los concentrados de zumos de frutas y los alimentos ácidos.

**Candida.** La especie *C. utilis* se cultiva para la obtención de proteína unicelular para incorporarla tanto a alimentos destinados al consumo humano como a piensos. *C. lipolytica* produce alteración de la mantequilla y margarina.

**Brettanomyces.** Producen grandes cantidades de ácido e intervienen en la fermentación de la cerveza belga de tipo "lambic", de las cervezas inglesas y de los vinos franceses.

**Trichosporon.** Estas levaduras crecen mejor a temperaturas bajas, encontrándose, por ejemplo, en las fábricas de cerveza.

**Rhodotorula.** Estas levaduras de color rojo, rosa o amarillo, pueden producir manchas en la superficie de los alimentos como en la superficie de las carnes o zonas de color rosado en el *sauerkraut* (col ácida).

## **FUNDAMENTO**

El método se basa en inocular una cantidad conocida de muestra de prueba en un medio selectivo específico, acidificado a un pH 3.5 e incubado a una temperatura de  $25 \pm 1$  °C, dando como resultado el crecimiento de colonias características para este tipo de microorganismos. Esta prueba se lleva a cabo en condiciones de aerobiosis, que son adecuadas para estos grupos.

## **MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES**

- 1 matraz Erlenmeyer de 250 mL de capacidad, conteniendo 90.0 mL de solución amortiguadora de fosfatos de pH 7.2, estéril.<sup>a</sup>
- 3 tubos, con 9.0 mL de solución amortiguadora de fosfatos de pH 7.2, estériles con tapón de algodón.<sup>a</sup>
- 1 matraz Erlenmeyer de 250 mL con 80.0 mL del agar papa dextrosa (manejar todo el medio en matraz, en vez de tenerlo repartido en tubos, facilita la acidificación).<sup>a</sup>

## **NOTA**

La Norma Oficial Mexicana utiliza únicamente el agar papa dextrosa para la detección y cuantificación de estos grupos de microorganismos. Sin embargo, se sugiere para la cuantificación de las levaduras la utilización del agar extracto de malta acidificado, ya que es un medio más rico en nutrientes y adecuado para el desarrollo de este grupo microbiano.

- 1 matraz Erlenmeyer de 250 mL con 80.0 mL del agar extracto de malta (manejar todo el medio en matraz, en vez de tenerlo repartido en tubos, facilita la acidificación).<sup>a</sup>

## **SOLUCIONES, REACTIVOS E INDICADORES**

- Solución colorante de lactofenol azul de algodón.<sup>b</sup>
- Colorantes para tinción de Gram.<sup>b</sup>
- Solución estéril de ácido tartárico al 10.0%.<sup>a</sup>

## **MATERIAL Y EQUIPO**

- Vaso de licuadora estéril o bolsa para Stomacher®.<sup>a</sup>
- Motor para licuadora o Stomacher®.<sup>a</sup>
- Pipetas automáticas de 1 mL y puntas estériles.<sup>a</sup>
- Pipetas graduadas estériles de 10 mL con tapón de algodón.<sup>a</sup>
- Pipetas Pasteur estériles.<sup>a, b</sup>
- Cajas de Petri estériles (una se utiliza para pesar la muestra).<sup>a</sup>
- Utensilios estériles para la manipulación de muestras: cuchillos, cucharas, tenedores, etc.<sup>a</sup>
- Incubadora con termostato que pueda ser mantenido a  $25 \pm 1$  °C.<sup>a</sup>
- Baño de agua con control de temperatura y circulación, mantenido a  $45 \pm 1$  °C.<sup>a</sup>
- Portaobjetos, cubreobjetos, cinta adhesiva transparente.<sup>b</sup>
- Microscopio óptico.<sup>b</sup>
- Asa bacteriológica y asa micológica.<sup>b</sup>
- Contador de colonias de campo oscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrada y lente amplificador.<sup>b</sup>

## **NOTAS**

<sup>a</sup> Material necesario para el inicio de la práctica.

<sup>b</sup> Material necesario para los 3, 4 y/o 5 días después de iniciada la práctica.

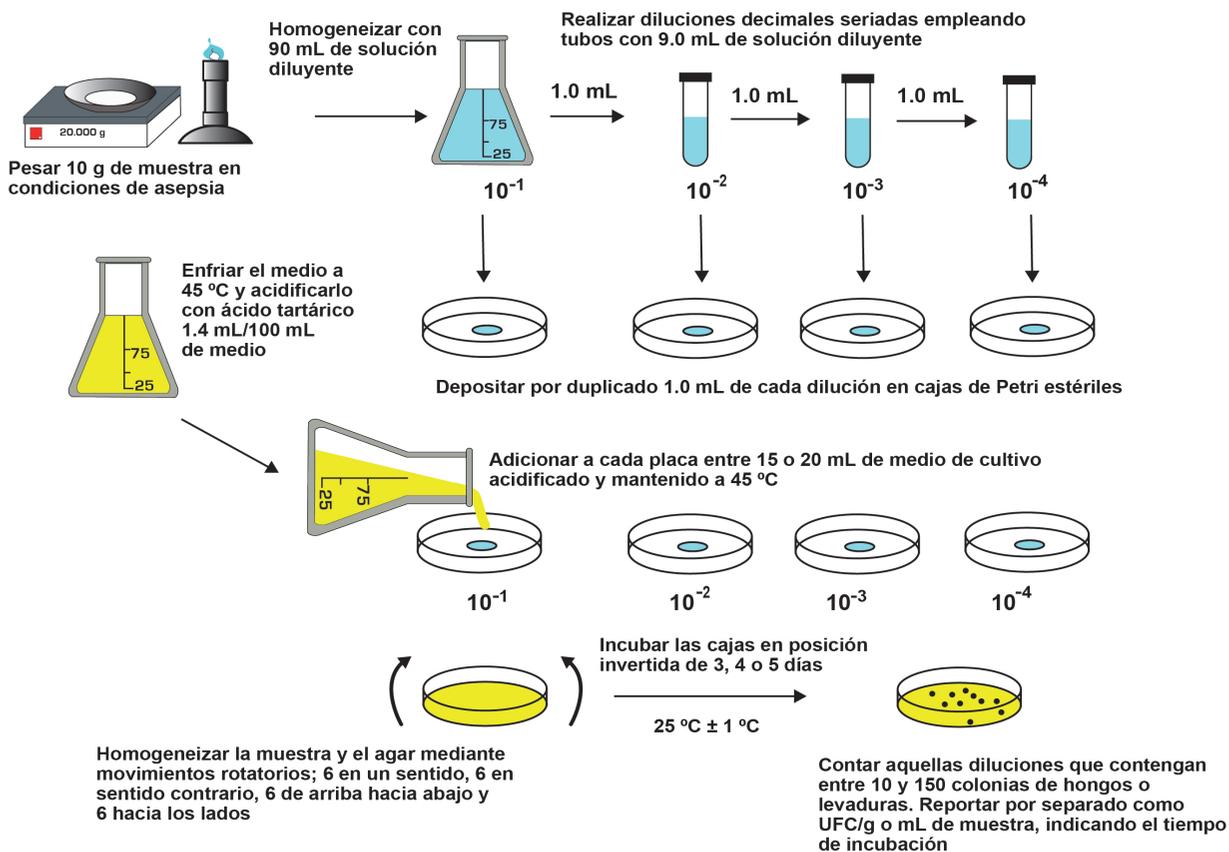


Figura 6.1 Determinación de mohos y levaduras en alimentos.

## **PROCEDIMIENTO**

- Pesar 10.0 g de muestra en una caja Petri estéril y pasarla a un matraz Erlenmeyer que contenga 90.0 mL de una solución amortiguadora de fosfatos de pH 7.2 o agua peptonada al 0.1%.
- Homogeneizar la muestra con la solución anterior en un vaso de licuadora estéril o pasarla a una bolsa de Stomacher® y homogeneizar durante 10 s a velocidad mínima en licuadora. Si se utiliza el Stomacher®, homogeneizar a velocidad media por 30 s. Ésta es la dilución primaria.
- De la suspensión o solución anterior, tomar 1.0 mL y transferirlo a un tubo de ensayo que contenga 9.0 mL de solución amortiguadora de fosfatos de pH 7.2, agitar y repetir esta operación tantas veces como diluciones sean necesarias. Se debe utilizar una punta estéril en la pipeta, para cada dilución.

## **NOTAS**

Los microorganismos filamentosos forman las colonias a partir de una spora o de un fragmento de hifa o de un cúmulo de hifas. Debido a esto, el número de UFC/mL puede variar dependiendo de las condiciones de homogeneización de la muestra; a mayor tiempo de homogeneización mayor será la ruptura de las hifas y, por lo tanto, aumentarían las UFC/mL, por lo que se debe poner especial cuidado en esta etapa. Los tiempos de homogeneización citados en esta metodología son los recomendados en la Norma Oficial Mexicana para este grupo microbiano.

- Colocar por duplicado en cajas de Petri estériles 1.0 mL de cada una de las diluciones de la muestra, utilizando una pipeta estéril.
- Para acidificar los medios a un pH de 3.5, se adicionan 1.4 mL de la solución estéril de ácido tartárico al 10% por cada 100 mL de medio de cultivo, previamente fundido y enfriado a 45 °C. No debe agregarse ácido al medio más caliente (ni volver a calentar el medio acidificado) pues el ácido hidroliza el agar a temperaturas > 50 °C.
- La norma recomienda que después de la acidificación, se utilice un tubo de medio acidificado como testigo y se mida el pH para corroborar que se encuentre a 3.5 utilizando un potenciómetro.
- En cada caja de Petri con inóculo, verter de 15 a 20 mL de agar papa dextrosa acidificado (o agar extracto de malta acidificado), mantenido a 45 °C. El tiempo transcurrido entre la preparación de las diluciones y el momento en que es vertido el medio de cultivo no debe de exceder de 20.0 min.

- Mezclar cuidadosamente el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis en el sentido de las manecillas del reloj, seis en sentido contrario y seis de atrás hacia adelante, sobre una superficie lisa, teniendo cuidado de no humedecer con el medio la tapa de la caja de Petri. Permitir que la mezcla en las cajas de Petri solidifique, dejándolas reposar sobre una superficie horizontal fría.
- Verificar la esterilidad del medio acidificado, para lo cual se verterá en una caja de Petri sin inóculo, de 15 a 20 mL del medio en cuestión; se deja solidificar y se incuba con las demás placas. Después de la incubación esta caja no deberán presentar desarrollo de colonias.
- Invertir las cajas y colocarlas en la incubadora a  $25 \pm 1$  °C.
- Contar las colonias de cada placa después de 3, 4 y 5 días de incubación. Seleccionar aquellas placas que contengan entre 10 y 150 colonias. Si alguna de las cajas muestra crecimiento extendido de mohos o si es difícil contar colonias bien aisladas, considerar la cuantificación de 4 días de incubación o incluso las de 3 días. En este caso, se informa el período de incubación en los resultados de los análisis.

Los microorganismos filamentosos forman las colonias a partir de una spora o de un fragmento de hifa o de un cúmulo de hifas. Debido a esto, el número de UFC/mL puede variar al revisar las cajas y retirar las mismas en los tiempos recomendados de incubación; un manejo brusco de las cajas al retirar de la incubadora ocasionará la ruptura de las hifas y, por lo tanto, aumentará las UFC/mL, por lo que se debe poner especial cuidado en esta etapa.

- Considerar las cuentas de placas con 10 a 150 colonias como las adecuadas para el informe. Multiplicar por el inverso de la dilución.
- Informar las unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro (UFC/g o mL) de mohos y levaduras (cada uno en forma independiente), incubadas a  $25 \pm 1$  °C durante 5 días.
- Consultar la NOM aplicable al alimento analizado. Establecer si la muestra cumple con la especificación de NOM para mohos y levaduras.

### **Para completar el ejercicio**

- Realizar una tinción por impronta húmeda para mohos con colorante de lactofenol azul de algodón, para un examen microscópico y una identificación presuntiva de los mohos que se hayan desarrollado.

- Realizar una tinción simple para la observación microscópica de las levaduras obtenidas.
- Describir las características macroscópicas y microscópicas observadas, de los mohos y/o levaduras desarrollados a partir de la muestra analizada.
- Relacionar los resultados con el alimento analizado, en lo posible.

### **CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS**

Para elaborar un informe de resultados se deben aplicar las reglas de la cuenta en placa, de la NOM-092-SSA1-1994. Específicamente recuerde:

- Seleccionar las placas que contengan entre 10 y 150 colonias (representatividad estadística).
- Contar las colonias presentes y calcular el número de hongos y levaduras por separado.
- Calcular las unidades formadoras de colonias por gramo o por mililitro de la muestra analizada, aplicando el factor de dilución.
- En el caso de que ninguna placa contenga más de 10 colonias (UFC) de hongos y/o levaduras, se debe reportar el número obtenido de UFC indicando la dilución correspondiente.
- En el caso de no encontrar colonias características de hongos y/o levaduras, el resultado a reportar es:
  - ✓ <10 UFC/g o
  - ✓ <10 UFC/mL.

Para cualquiera de los casos citados, se deberá reportar el tiempo de incubación en el que se realizó la cuantificación.

### **ANÁLISIS CUALITATIVO**

Reportar las observaciones macroscópicas y microscópicas de los diferentes tipos de colonias de mohos y levaduras obtenidas durante el análisis, incluyendo la identificación presuntiva de los géneros.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Ahmed L.I., Morgan S.D., Hafez R.S. & Abdel-All A.A.A. (2014). Hygienic Quality of some Fermented Milk Products. *Int. Journ.of Dairy Sci.* 9, 3:63-73.  
DOI: [10.3923/ijds.2014.63.73](https://doi.org/10.3923/ijds.2014.63.73)
- Beuchat L.R. & Cousin M.A. (2001). Yeasts and Molds. In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4<sup>th</sup> ed. Downs F.P. & Ito K. (Eds.) APHA. Washington. 209-215.
- Bibek R. & Bhunia A. (2014). *Fundamental Food Microbiology*, 5<sup>th</sup> ed. CRC Press, USA.
- Cornell University (2015). *Mycotoxins*. Department of Animal Science. College of Agriculture and Life Sciences. Recuperado el 5 de septiembre de 2016 de <http://poisonousplants.ansci.cornell.edu/toxicagents/mycotoxin.html>.
- ICMSF (2005). *Microorganisms in Foods 6*. Chapman & Hall. 2<sup>nd</sup> ed. International Commission on Microbiological Specifications of Foods.
- Köppen R., Koch M., Siegel D., Merkel S., Maul R. & Nehl I. (2010). Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 86:1595-1612. DOI: 10.1007/s00253-010-2535-1
- Parada N.R. (2014). Micotoxicosis del Ganado. *Toxicología Clínica Veterinaria*. Tardis. Chile. Recuperado el 5 de septiembre de 2016 de <http://www.ropana.cl/Toxivet/Micotoxinas.htm>
- Pierson M. & Smoot L. (2001) Indicator Microorganisms and Microbiological Criteria. In: *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. 2<sup>nd</sup> ed. Doyle M. Beuchat L. & Montville T. (Eds.) ASM Press. USA. 71-87.
- Secretaría de Salud (1995). Norma Oficial Mexicana. NOM-111-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- Tournas V., Stack M.E., Mislivec P.B., Koch H.A. & Bandler R. (2001). Bacteriological Analytical Manual Chapter 18. *Yeasts, Molds and Mycotoxins*. U.S. Food and Drug Administration. Recuperado el 5 de septiembre de 2016. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071435.htm>.

**Otras referencias para el tema de Micotoxinas**

- Hocking A. (2001). Toxigenic *Aspergillus* Species. In: *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. 2<sup>nd</sup> ed. Doyle M. Beuchat L. & Montville T. (Eds.) ASM Press. USA. 451-465.
- Pitt J. (2001). Toxigenic *Penicillium* Species. In: *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. 2<sup>nd</sup> ed. Doyle M. Beuchat L. & Montville T. (Eds.) ASM Press. USA. 467-480.

# **7** Método aprobado para la estimación de la densidad de coliformes totales, fecales y *E. coli* por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua

---

## **OBJETIVOS**

- Evaluar la calidad sanitaria de muestras de agua o alimentos mediante la determinación de coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli*.
- Diferenciar a los organismos coliformes totales de los coliformes fecales.
- Llevar a cabo la determinación de *E. coli* a partir del método de NMP.
- Interpretar las implicaciones de la presencia de coliformes y/o *E. coli* en alimentos.

## **GENERALIDADES**

Debido a que un gran número de enfermedades son transmitidas por vía fecal-oral utilizando como vehículo los alimentos y el agua, es necesario contar con microorganismos que funcionen como indicadores de contaminación fecal. Éstos deben ser constantes, abundantes y exclusivos de la materia fecal; deben tener una sobrevivencia similar a la de los patógenos intestinales y ser capaces de desarrollarse extra intestinalmente. El grupo coliforme constituye un grupo heterogéneo con hábitat primordialmente intestinal para la mayoría de las especies que involucra, es constante, abundante y casi exclusivo de la materia fecal, su capacidad de sobrevivencia y multiplicación fuera del intestino también se observan en aguas potables, por lo que este grupo se utiliza como indicador de contaminación fecal en agua; encontrándose que mientras mayor sea el número de coliformes en agua, mayor será la probabilidad de estar frente a una contaminación reciente.

Cuando los coliformes llegan a los alimentos no sólo sobreviven, sino que se pueden multiplicar, por lo que en los alimentos el grupo coliforme adquiere un significado distinto al que recibe en el agua. Cuando los productos alimenticios

han recibido un tratamiento térmico (pasteurización, horneado, cocción), estos microorganismos deben ser eliminados; por lo tanto, su presencia es indicativa de procesos deficientes.

Para su estudio, se dividen en dos grupos. El grupo de bacterias **coliformes totales**, el cual comprende a todos los bacilos Gram-negativo aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas en un lapso máximo de 48 h a  $35 \pm 1$  °C. Este grupo está conformado por cuatro géneros principalmente: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter* y *Klebsiella*. El grupo de **coliformes fecales** está constituido por bacterias Gram-negativo capaces de fermentar la lactosa con producción de gas a las 48 h de incubación a  $44.5 \pm 0.2$  °C. Este grupo no incluye una especie determinada; sin embargo, la más prominente es *Escherichia coli*.

La demostración y el recuento de organismos coliformes puede realizarse mediante el empleo de medios de cultivo líquidos y sólidos con características selectivas y diferenciales. La determinación en medios líquidos mediante la técnica de tubos múltiples de fermentación tiene la ventaja de que se inocula una gran cantidad de muestra (en comparación con los métodos de cuenta en placa), por lo que permite detectar poblaciones muy bajas en los alimentos.

***Escherichia coli*** es un bacilo corto Gram negativo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* (bacterias entéricas); existe como comensal en el intestino delgado de humanos y animales. Por esa razón y gracias a la proliferación de métodos muy prácticos y confiables para su determinación, es el mejor indicador de contaminación fecal en alimentos.

Algunas cepas de *E. coli* pueden ser patógenas y provocar enfermedades diarreicas. Éstas se clasifican con base en factores de virulencia únicos, que determinan el mecanismo de la enfermedad que provocan. Se sabe que las propiedades de adherencia a las células epiteliales de los intestinos grueso y delgado son codificadas por genes situados en plásmidos. De manera similar las toxinas son mediadas por plásmidos o fagos (Ríos y Dávila, 2013).

Este grupo de bacterias se encuentra constituido por las cepas implicadas en ETAs: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC, por sus siglas en inglés), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* enteroadherente difusa (DAEC). Existen otras cepas que no han sido perfectamente caracterizadas. El siguiente cuadro resume algunas propiedades y síntomas causados por las cepas patógenas de *Escherichia coli*. Esta información se puede ampliar y complementar en la bibliografía.

**CUADRO 7.1** Propiedades y síntomas causados por algunas cepas de *Escherichia coli* patógenas.

	<b>ETEC</b>	<b>EPEC</b>	<b>EHEC</b>	<b>EIEC</b>
<b>Toxina</b>	Lábil/estable	-	Shiga o vero	-
<b>Invasiva</b>	-	-	-	+
<b>Intiminas</b>	-	+	+	-
<b>Enterohemolisina</b>	-	-	+	-
<b>Aspecto de heces</b>	Aguadas	Aguadas sanguinolentas	Aguadas muy sanguinolentas	Mucoides y sanguinolentas
<b>Leucocitos en heces</b>	-	-	-	+
<b>Fiebre</b>	Baja	+	-	+
<b>Intestino involucrado</b>	Delgado	Delgado	Colon	Colon y delgado
<b>Dosis infectiva</b>	Alta	Alta	Baja	Alta
<b>Serotipos</b>	Varios	O26, O111 y otros	O157:H7, O26, O111 y otros	Varios

**FUNDAMENTO**

La metodología se basa en la detección de bacterias del grupo coliforme como indicador de la calidad sanitaria del agua o como indicador de las condiciones sanitarias en el procesamiento de alimentos. Los coliformes totales, fecales y *E. coli* continúan siendo el grupo indicador de elección que manifiesta contaminación fecal reciente o condiciones higiénicas inadecuadas.

El método del NMP consiste de una prueba presuntiva y confirmativa. El uso de las series de tres, cinco y diez tubos va a depender de la contaminación esperada y el grado de exactitud deseada. Se basa en la dilución de la muestra en tubos múltiples, de tal forma que todos los tubos de la menor dilución sean positivos y todos los tubos de la dilución mayor sean negativos. El resultado positivo se demuestra por la presencia de gas y crecimiento microbiano, característica de los microorganismos coliformes por producir gas a partir de la fermentación de lactosa a

$35 \pm 0.5$  °C (para coliformes totales), a  $45.5 \pm 0.2$  °C (para coliformes fecales y *E. coli* en alimentos) y a  $44.5 \pm 0.2$  °C (para coliformes fecales y *E. coli* en agua) dentro de las 24 a 48 h de incubación.

Para obtener el número más probable (NMP) de los resultados obtenidos, se aplica la teoría de la probabilidad, que tiene como condición lo siguiente:

- Debe existir una distribución aleatoria de las bacterias presentes en la muestra.
- Las bacterias se encuentran como entidades no agrupadas.
- Los microorganismos presentes en la muestra crecerán en el medio al ser incubados y se mantendrán en las condiciones adecuadas para su desarrollo.

En la fase presuntiva, el medio de cultivo que se utiliza es el caldo lauril triptosa, el cual permite la recuperación de los microorganismos dañados que se encuentren presentes en la muestra y que sean capaces de utilizar a la lactosa como fuente de carbono. Durante la fase confirmativa, se emplea como medio de cultivo para determinar a los microorganismos coliformes totales el caldo lactosado bilis verde brillante, el cual es selectivo y sólo permite el desarrollo de aquellos microorganismos capaces de tolerar tanto las sales biliares como el verde brillante.

La determinación del número más probable de microorganismos coliformes fecales se realiza a partir de los tubos positivos de la prueba presuntiva. El cálculo del resultado se hace a partir de tablas elaboradas estadísticamente para relacionar la combinación de tubos positivos con el "número más probable" de microorganismos presentes en la muestra. El método tiene gran versatilidad y permite detectar cuentas muy bajas de microorganismos, gracias a que se inocula una gran cantidad de muestra; también pueden hacerse múltiples diluciones para cuantificar poblaciones muy grandes. Existen algunas variantes para llevarlo a cabo, como 3 series de 3 tubos, 3 series de 5 tubos; modernamente se utilizan versiones con una sola serie de 5 o 10 tubos, con inóculos mucho mayores.

Respecto a la detección de *E. coli* por este método, se sabe que alrededor del 96% de las cepas de este microorganismo, incluso las cepas anaerogénicas, producen la enzima beta-glucuronidasa (GUD), la cual rompe el sustrato específico 4-metilumbeliferil-beta-D-glucurónido (MUG) en 4-metilumbeliferona (MU), que al ser expuesto a una fuente de luz UV de onda larga (365 nm) produce una fluorescencia azul, fácil de observar cuando el MUG es incorporado al caldo EC o al caldo lauril. La producción de GUD por otras bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* es rara. Algunas cepas o especies de *Shigella* (44%-58%) y *Salmonella* spp. (20%-29%) son GUD positiva; sin embargo, no se considera una desventaja

de esta prueba para su uso en Salud Pública. Una excepción a esta respuesta es la *E. coli* enterohemorrágica serotipo O157:H7, que es GUD negativa; por lo que es común que esta prueba se utilice para diferenciar este serotipo de las demás *E. coli*.

Si se espera una cuenta microbiana alta, la muestra deberá diluirse para dar cumplimiento a las condiciones. La forma más común de realizar esta prueba es mediante diluciones decimales y usando un inóculo en series de tubos.

La identificación de *Escherichia coli* también puede realizarse por el método tradicional que implica aislar colonias en medios selectivos y diferenciales (agar Mac Conkey, agar Eosina azul de metileno), purificar y, posteriormente, realizar las pruebas bioquímicas básicas (IMViC) a las colonias típicas.

En México, este método está descrito en el “Apéndice H Normativo. Método aprobado para la estimación de la densidad de Coliformes Fecales y *E. coli* por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua”, que es parte de la NOM-210-SSA1-2015. Este Apéndice entró en vigor en septiembre de 2016 y deroga a la NOM-112-SSA1-1994 “Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable”.

## **MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES**

### **1. Para análisis de agua**

- 5 o 10 tubos con 10.0 mL de caldo lauril triptosa con campana de Durham.<sup>a</sup>
- 5 o 10 tubos con 10.0 mL de caldo bilis verde brillante con campana de Durham.<sup>b</sup>
- 5 o 10 tubos con 10.0 mL de caldo EC con campana de Durham o caldo EC con MUG con campana de Durham.<sup>b</sup>
- 2 cajas de Petri con agar cuenta estándar.<sup>b</sup>
- 2 cajas con agar Eosina azul de metileno.<sup>b</sup>
- 6 tubos con 3.0 mL de caldo RM-VP.<sup>c</sup>
- 3 tubos con 3.0 mL de caldo triptona al 1%.<sup>c</sup>
- 3 tubos con 3.5 mL de caldo citrato Koser. Citrato de Simmons.<sup>c</sup>

## 2. Para análisis de alimentos

- 1 matraz con 225.0 mL de agua peptonada al 0.1% o solución amortiguadora de fosfatos.<sup>a</sup>
- 2 tubos con 9.0 mL de agua peptonada al 0.1% o solución amortiguadora de fosfatos.<sup>a</sup>
- 9 o 15 tubos con 10.0 mL de caldo lauril triptosa con campana de Durham.<sup>a</sup>
- 9 o 15 tubos con 10.0 mL de caldo bilis verde brillante con campana de Durham.<sup>b</sup>
- 9 o 15 tubos con 10.0 mL de caldo EC con campana de Durham o caldo EC con MUG con campana de Durham.<sup>b</sup>
- 2 cajas de Petri con agar cuenta estándar.<sup>c</sup>
- 2 cajas con agar Eosina azul de metileno.<sup>c</sup>
- 6 tubos con 3.0 mL de caldo RM-VP.<sup>c</sup>
- 3 tubos 3.0 mL de caldo triptona 1%.<sup>c</sup>
- 3 tubos con 3.5 mL de caldo citrato de Koser o agar citrato de Simmons, inclinado.<sup>c</sup>

### **SOLUCIONES E INDICADORES**

- Frascos con gotero con reactivo de Ehrlich o Kovac.<sup>d</sup>
- Frascos con gotero con indicador rojo de metilo.<sup>f</sup>
- Frascos con gotero con alfa naftol (VP1).<sup>e</sup>
- Frascos con gotero con solución de hidróxido de potasio al 40% (VP2).<sup>e</sup>
- Reactivos para la tinción de Gram.<sup>b</sup>

### **MATERIAL Y EQUIPO**

- Mechero.<sup>a, b, c, d, e, f</sup>
- Pipetas automáticas de 1 mL y puntas estériles.<sup>a</sup>
- Gradilla.<sup>a, b, c, e</sup>
- Balanza granataria.<sup>a</sup>
- Stomacher®<sup>a</sup> y bolsas para Stomacher®.
- Lámpara de luz ultravioleta de longitud amplia 4 watts (366 nm).<sup>c</sup>

- Pipetas de 10.0 mL estériles, con tapón de algodón.<sup>a</sup>
- Pipetas Pasteur estériles.<sup>a, b, c, d</sup>
- Asa bacteriológica.<sup>b, c, d, e</sup>
- Portaobjetos.<sup>d</sup>
- Microscopio óptico.<sup>d</sup>
- Termómetro calibrado.<sup>b</sup>
- Baño de agua a  $44.5 \pm 0.2$  °C.<sup>b</sup>
- Baño de agua a  $45.5 \pm 0.2$  °C.<sup>b</sup>
- Incubadora a  $35 \pm 0.5$  °C.<sup>a</sup>
- Incubadora a  $35 \pm 1.0$  °C.<sup>a</sup>
- Horno para esterilizar material de vidrio de 160 a 180 °C.<sup>a</sup>
- Autoclave.<sup>a</sup>

## **NOTAS**

<sup>a</sup> Material necesario al inicio de la práctica.

<sup>b</sup> Material necesario a las 48 h de iniciada la práctica.

<sup>c</sup> Material necesario a las 96 h de iniciada la práctica.

<sup>d</sup> Material necesario a las 120 h de iniciada la práctica.

<sup>e</sup> Material necesario a las 144 h de iniciada la práctica.

<sup>f</sup> Material necesario a las 168 h de iniciada la práctica.

## **PROCEDIMIENTO**

### **1. Agua y hielo**

#### **1.1 Prueba presuntiva**

##### **Agua para uso y consumo humano**

- Agitar vigorosamente la muestra 25 veces en un arco de 30° por 7 s. La cantidad necesaria para el análisis deberá ser de 100 mL como mínimo para transferir volúmenes de acuerdo con la **Tabla 7.1**, a cada uno de los tubos con caldo lauril triptosa a la concentración adecuada.

**TABLA 7.1** Preparación de inóculo con caldo lauril triptosa.

Cantidad de muestra inoculada (mL)	Cantidad de medio por tubo (mL)	Volumen de medio más inóculo (mL)	Caldo lauril triptosa requerido (g/L)
1	10 o más	11 o más	35.6
10	10	20	71.2
10	20	30	53.4
20	10	30	106.8
100	50	150	106.8
100	35	135	137.1
100	20	120	213.6

- Agitar los tubos para homogeneizar la muestra. Incubar los tubos de caldo lauril triptosa inoculados, a  $35 \pm 0.5$  °C. Examinar los tubos a las 24 h y observar si hay evidente formación de gas. Si no se observa la formación de gas, incubar 24 h más y anotar los resultados.

### Hielo

- Fundir por completo el hielo a 45 °C y realizar el análisis como agua para uso y consumo humano.

### 1.2. Prueba confirmativa de microorganismos coliformes totales

- Transferir de 2 a 3 asadas de cada tubo positivo obtenido durante la prueba presuntiva (caldo lauril triptosa) a otro tubo de 16 x 150 mm que contenga caldo bilis verde brillante, con campana de Durham.
- Agitar los tubos para su homogeneización.
- Incubar los tubos a  $35 \pm 0.5$  °C por  $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ .
- Registrar como positivos aquellos tubos en donde se observe turbidez (crecimiento).
- Consultar las tablas 1 o 2 de NMP de cada tubo para conocer el número más probable de organismos coliformes totales/100 mL.

### 1.3. Prueba confirmativa de microorganismos coliformes fecales

- Transferir de 2 a 3 asadas de cada tubo positivo obtenido durante la prueba presuntiva (caldo lauril triptosa) a otro tubo de 16 x 150 mm que contenga caldo EC con campana de Durham.
- Agitar los tubos para su homogeneización.
- Incubar los tubos a  $44.5 \pm 0.2$  °C en incubadora o baño de agua durante 24 h, observar si hay formación de gas, registrar la lectura, en caso de no haber formación de gas, incubar 24 h más.
- Registrar como positivos aquellos tubos en donde se observe turbidez (crecimiento).
- Consultar las tablas 1 o 2 de NMP de cada tubo para conocer el número más probable de organismos coliformes totales/100 mL.

#### **NOTA**

Para todos los alimentos que se les determine coliformes fecales, la incubación debe ser a  $45.5 \pm 0.2$  °C por 24 h a 48 h, excepto para muestras de agua, que deberán incubarse a  $44.5 \pm 0.2$  °C de 24 h a 48 h.

#### **Control de calidad**

- Inocular en tubos de caldo EC un control positivo de *Escherichia coli* y un control negativo de *Enterobacter aerogenes*. Incubar con las muestras.

### 1.4. Prueba confirmativa para *Escherichia coli* (por identificación bioquímica)

#### **Prueba presuntiva**

- Tomar una asada de cada uno de los tubos positivos de caldo EC y sembrar por estría cruzada en agar EMB-L para su aislamiento.
- Incubar las placas invertidas a  $35 \pm 1$  °C por 18 a 24 h.
- Seleccionar 2 colonias de cada placa con la siguiente morfología colonial: colonias con centro negro, planas, con o sin brillo metálico y sembrarlas en agar cuenta estándar (placa o agar inclinado) para realizar las pruebas de morfología microscópica y pruebas bioquímicas. Si no hay colonias con morfología típica, probar una o más colonias lo más parecido a *E. coli* de cada placa.

- Incubar las placas o tubos a  $35 \pm 1$  °C por 18 a 24 h.
- Realizar un frotis y teñirlo por Gram. Observar al microscopio la presencia de bacilos cortos Gram negativo.

#### **1.4.1. Identificación bioquímica de *Escherichia coli* mediante pruebas bioquímicas**

A partir de las cajas con agar cuenta estándar, seleccionar una colonia, resuspender en 2 mL de solución salina isotónica para realizar las siguientes pruebas bioquímicas.

##### **a. Producción de indol**

- Tomar una asada de la suspensión bacteriana e inocular un tubo con caldo triptona e incubarlo a  $35 \pm 0.5$  °C por  $24 \pm 2$  h.
- Finalizada la incubación, adicionar de 0.2 mL a 0.3 mL del reactivo de Kovac, dejando caer las gotas del reactivo por las paredes del tubo y no agitar los tubos para observación del anillo rojo en la superficie.
- La presencia de una coloración roja en la superficie del tubo se considera una prueba positiva.

##### **b. Producción de ácidos mixtos (rojo de metilo)**

- Tomar una asada de la suspensión bacteriana e inocular un tubo con caldo MR-VP e incubar a  $35 \pm 0.5$  °C por 48 h.
- Finalizada la incubación, adicionar 5 gotas de rojo de metilo.
- Se considera una prueba positiva cuando se desarrolla un color rojo. Un color amarillo definido es una prueba negativa.

##### **c. Producción de metabolitos neutros**

- Tomar una asada de la suspensión bacteriana e inocular un tubo con caldo MR-VP e incubar a  $35 \pm 0.5$  °C por  $48 \pm 2$  h.
- Finalizada la incubación, adicionar 0.6 mL de solución  $\alpha$ -naftol y 0.2 mL de KOH al 40% y agitar.
- Dejar reposar el tubo destapado durante 10 minutos en una zona aséptica; cuando se desarrolla un color de rosa a rojo se considera una prueba positiva.

**d. Utilización de citrato**

- Tomar una asada de la suspensión bacteriana e inocular un tubo con caldo citrato de Koser, evitar turbiedad en el tubo.
- Incubar a  $35 \pm 0.5$  °C por 96 h.
- Una reacción positiva se observa mediante el desarrollo de turbiedad detectable.
- Se puede utilizar como alternativa citrato de Simmons, el cual se debe inocular por estría. Incubar  $35 \pm 0.5$  °C por 48 h. Una prueba positiva se observa mediante crecimiento y/o cambio a una coloración azul; la ausencia de crecimiento se considera una prueba negativa.

**1.4.2 Prueba confirmativa opcional para Escherichia coli utilizando caldo EC-MUG (4 metil-umbeliferil- $\beta$ -D-glucurónido)**

Tomar dos o tres asadas de cada uno de los tubos positivos de caldo EC y sembrar en caldo MUG. Incubar los tubos a  $35 \pm 1$  °C durante 24 a 48 h. Se consideran positivos los tubos que presentan fluorescencia bajo luz UV. Deben utilizarse siempre un control positivo con *E. coli* y un control negativo inoculado con *E. aerogenes*. Se interpreta el número de *E. coli* a partir de las tablas de NMP.

**2. Alimentos****2.2 Preparación de la muestra**

- Pesar 25 g del alimento.
- Adicionar el alimento en 225.0 mL de regulador de fosfatos o diluyente de peptona y moler por 2 min en vaso de licuadora u homogeneizador peristáltico, el volumen total en el vaso debe cubrir totalmente las aspas.
- Dejar reposar de 2 a 3 min.
- En caso de que la cantidad de muestra disponible sea menor a 25 g y el análisis necesite ser efectuado (por denuncia o queja ante la autoridad), utilizar una cantidad de muestra que represente una proporción 1:10.
- Realizar 2 diluciones decimales más utilizando tubos con 9.0 mL de agua peptonada al 0.1%.

### **2.2.1. Prueba presuntiva**

- Añadir 1.0 mL de la dilución  $10^{-1}$  g/mL a cada uno de los 3 tubos con 10.0 mL de caldo lauril triptosa.
- Añadir 1.0 mL de las diluciones  $10^{-2}$  g/mL y  $10^{-3}$  g/mL a cada uno de los 3 tubos con 10.0 mL de caldo lauril triptosa.
- Una vez inoculados, incubar a  $35 \pm 0.5$  °C.
- Examinar los tubos a las 24 h y observar si hay formación de gas. Anotar los resultados. Si la formación de gas no se observa, incubar 24 h y anotar los resultados.

### **2.3. Prueba confirmativa de microorganismos coliformes totales**

- Transferir de 2 a 3 asadas de cada tubo positivo obtenido durante la prueba presuntiva (caldo lauril triptosa) a otro tubo de 16 x 150 mm que contenga caldo bilis verde brillante, con campana de Durham.
- Agitar los tubos para su homogeneización.
- Incubar los tubos a  $35 \pm 0.5$  °C por  $48 \pm 2$  h.
- Registrar como positivos aquellos tubos en donde se observe turbidez (crecimiento).
- Consultar las tablas 3, 4, 5 o 6 de NMP de cada tubo para conocer el número más probable de organismos coliformes totales/g.

### **2.4. Prueba confirmativa de microorganismos coliformes fecales**

- Transferir de 2 a 3 asadas de cada tubo positivo obtenido durante la prueba presuntiva (caldo lauril triptosa) a otro tubo de 16 x 150 mm que contenga caldo EC con campana de Durham.
- Agitar los tubos para su homogeneización.
- Incubar los tubos a  $45.5 \pm 0.2$  °C en incubadora o baño de agua durante 24 h, observar si hay formación de gas, registrar la lectura, en caso de no haber formación de gas, incubar 24 h más.
- Registrar como positivos aquellos tubos en donde se observe turbidez (crecimiento).
- Consultar las tablas 3, 4, 5 o 6 de NMP de cada tubo para conocer el número más probable de organismos coliformes totales/g.

### Control de calidad

- Inocular en tubos de EC un control positivo de *E. coli* y un control negativo de *Enterobacter aerogenes* e incubar con las muestras.

### 2.5. Prueba confirmatoria de *Escherichia coli*

Confirmar la presencia de *Escherichia coli* en por lo menos el 10% de las pruebas con resultados positivos de coliformes fecales.

#### Prueba presuntiva

- Seguir lo indicado en el punto 2.2.1, utilizando caldo lauril con MUG en vez de caldo lauril.
- Inocular los tubos por 24 a 48 h a 35 °C.
- Examinar cada tubo con crecimiento (turbiedad y gas), después, observar los tubos en la oscuridad con una lámpara de luz UV.
- Una prueba positiva para *E. coli* es la presencia de fluorescencia en el tubo. La lectura a las 24 h de incubación, identifica a *E. coli* en un 83%-95%, mientras que a las 48 h de incubación la identifica en un 96%-100%.

#### Prueba confirmativa

- Tomar una asada de cada uno de los tubos positivos con caldo lauril con MUG y sembrar por estría cruzada en una placa de agar L-EMB.
- Incubar a  $35 \pm 1$  °C por 24 h.
- Hacer un frotis y teñirlo de Gram. Observar al microscopio la presencia de bacilos cortos Gram negativo.

### CÁLCULOS

- Con frecuencia es necesario calcular el NMP con cantidades de muestra diferentes de los enlistados en las tablas desde el primer número de la combinación encontrada. Si la cantidad de muestra es  $>0.01$  g, multiplicar el valor de NMP listado en la tabla utilizada por 10, dependiendo del procedimiento realizado.

- Un método alternativo para obtener el valor de NMP es usando la siguiente fórmula:  
(NMP/g de la tabla - 100) x (factor de dilución del tubo de en medio) = NMP/g.
- Para calcular el NMP/100 g, multiplicar por 100.

### EXPRESIÓN DE RESULTADOS

#### Expresar en NMP/g o mL para alimentos y NMP/100 mL para agua.

Cuando se obtienen resultados negativos (ausencia de gas en los tubos), informar el límite de detección que corresponde a menos del valor más bajo del NMP de la tabla utilizada.

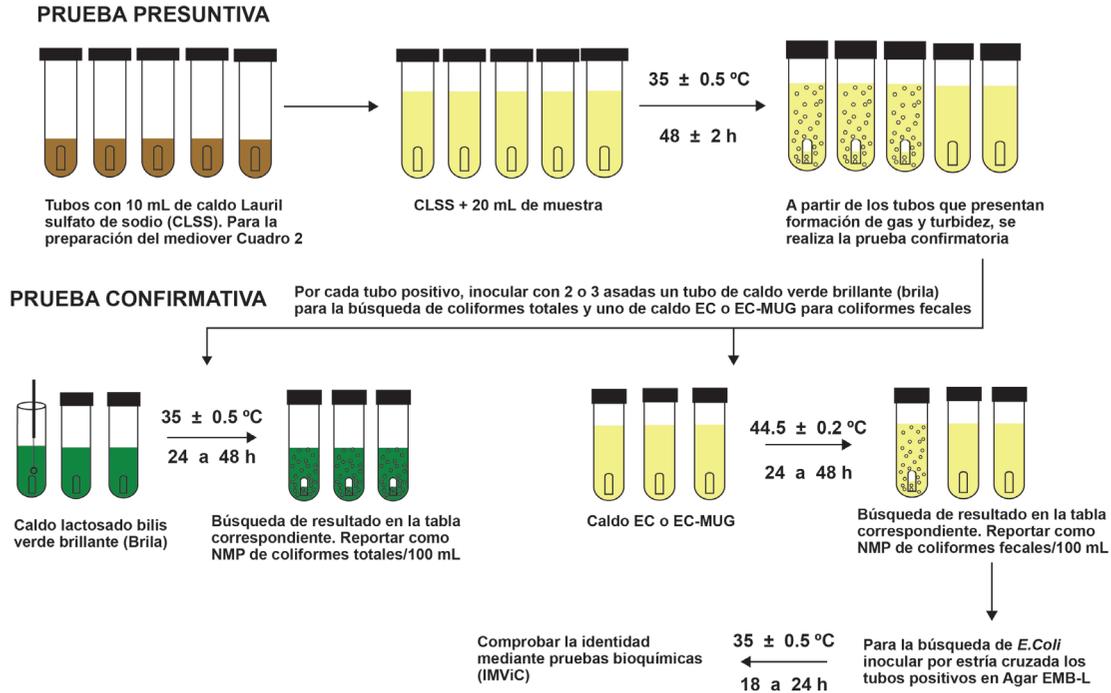
**CUADRO 7.2.** Ejemplos de la selección de resultados positivos para el cálculo del NMP.

E J E M P L O	Número de tubos positivos obtenidos de tres tubos incubados para las siguientes cantidades de muestra inoculada por tubo <sup>a</sup>						NMP <sup>b</sup>	
	Producto Líquido						Prod. líquido (mL <sup>-1</sup> )	Otros productos (g <sup>-1</sup> )
	(mL)	10	1	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>		
	Otros Prod.							
	(g)	1	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>		
(mayor dilución = menor concentración)								
1		3	3	<u>2</u>	1	0	15 (5)*	150 (6)*
2		3	3	<u>3</u>	0		24 (5)*	240 (6)*
3		2	<u>2</u>	1	1	0	7 (8)*	70 (7)*
4		3	3	<u>0</u>	0	0	2.4 (4)*	24 (5)*
5		<u>2</u>	2	0	1	0	0.21 (4)*	2.1 (5)*

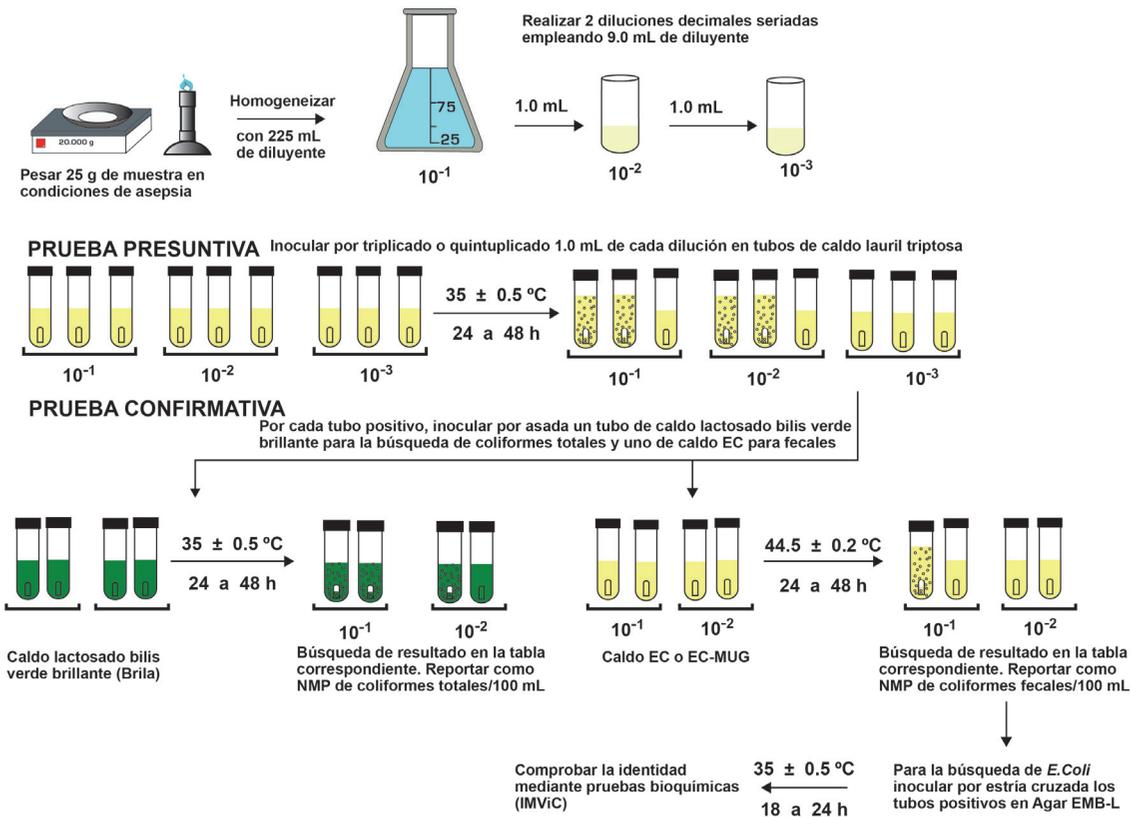
<sup>a</sup>      : combinación seleccionada

<sup>b</sup> Cálculo de NMP para 3 tubos.

\* Número de cuadro de consulta para el cálculo del índice del NMP



**Figura 7.1** Determinación de coliformes totales, fecales y *E. Coli* en agua y hielo por el método de número más probable.



**Figura 7.2** Determinación de coliformes totales, fecales y *E. Coli* en alimentos por el método de número más probable.

**TABLA 7.2** Índice del NMP con 95% de límite de confianza para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan 5 tubos con 20 mL de muestra de agua o hielo.

No. de tubos positivos	NMP/100 mL	95% de Límite de Confianza (aproximado)	
		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 7.3** Índice del NMP con 95% de límite de confianza para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan 10 tubos con 10 mL de muestra de agua o hielo.

No. de tubos positivos	NMP/100 mL	95% de Límite de Confianza (aproximado)	
		Inferior	Superior
0	<1.1	0.0	3.0
1	1.1	0.03	5.9
2	2.2	0.26	8.1
3	3.6	0.69	10.6
4	5.1	1.3	13.4
5	6.9	2.1	16.8
6	9.2	3.1	21.1
7	12.0	4.3	27.1
8	16.1	5.9	36.8
9	23.0	8.1	59.5
10	>23.0	13.5	Infinito

Se consideran como *Escherichia coli* todos los cultivos que correspondan a bacilos cortos o cocobacilos Gram negativos, no esporulados, fermentadores de la lactosa con producción de gas dentro de las 48 h a 35 °C y con las siguientes combinaciones para las pruebas IMViC:

**CUADRO 7.3.** Interpretación de pruebas bioquímicas para *E. coli*.

<i>E. coli</i>	Indol	Movilidad	Voges Proskauer	Citrato
Biotipo 1	+	+	-	-
Biotipo 2	-	+	-	-

Para calcular el NMP de *E. coli* utilizar la proporción de los tubos positivos de la prueba confirmatoria en caldo EC.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014. Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Apéndice H Normativo. Método aprobado para la estimación de la densidad de Coliformes totales, fecales y *E. coli* por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua. Diario Oficial de la Federación, 26 junio 2016. México. Recuperado el 26 junio de 2016 de [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015).
- CCAYAC-M-004 (2006) Estimación de la densidad microbiana por la técnica del número más probable, detección de coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli* por el número más probable. México.
- Feng P., Weagant S.D., Grant M.A. & Burkhardt W. (2002). *Chapter 4 Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria. Bacteriological Analytical Manual*. U.S. Food and Drug Administration. Recuperado el 27 de mayo de 2016 de <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm>
- Kornacki J.L. & Johnson J.L. (2001). *Enterobacteriaceae, Coliforms, and Escherichia coli as Quality and Safety Indicators*. En: Downs F.P. & Ito K. (Eds.). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (pp. 69-82) Washington: APHA.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H. & Stahl D.A. (2015). *Biology of Microorganisms*. 14ª ed. USA: Pearson Education .

- Molina-López J. y Eslava-Campos C.A. (2015). *Escherichia coli* diarrogénica. Recursos en Bacteriología. Depto de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina. UNAM. Recuperado el 27 de mayo de 2016 de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichiacoli.html>.
- Ríos-Gómez N.M. y Dávila-Valles R.G. (2013) [En línea]. Actividad Antibacteriana *in vitro* de *Geranium ayavacense* sobre *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staph. aureus*. Tesis Q. Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Perú. Recuperado el 27 de mayo de 2016 de <http://dspace.unapiquitos.edu.pe/bitstream/unapiquitos/333/1/ACTIVIDAD%20ANTIBACTERIANA%20IN%20VITRO%20DE%20GERANIUM%20AYAVACENSE.pdf>.
- Rodríguez-Ángeles G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública de México, 44, 464-476.



# 8

## Determinación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico en alimentos

---

### OBJETIVOS

- Realizar adecuadamente la cuantificación de *S. aureus* enterotoxigénico en alimentos mediante la metodología descrita en la Norma Oficial Mexicana correspondiente.
- Analizar el fundamento de la metodología utilizada y, con base en las especificaciones correspondientes al alimento analizado, determinar si éste es apto o no para consumo humano.

### GENERALIDADES

*Staphylococcus* es un género de bacterias en forma de cocos, Gram positivo, inmóvil, catalasa positivo. Tienden a agruparse en pares, cadenas cortas y en forma de racimos de uvas. Los miembros de este género son especialmente ubicuos, es decir, que tienden a estar presentes en muy diversos ambientes, incluyendo animales y cuerpo humano; por ello es relativamente fácil que los alimentos se contaminen con este género.

Las bacterias del género *Staphylococcus* son mesófilas, no producen esporas, pueden resistir largos periodos en forma desecada. Crecen bien a temperaturas entre 7 y 47.8 °C, con temperatura óptima de 35 °C. Su pH óptimo es de 7 a 7.5, pero crecen entre 4.5 y 9.3. Son capaces de crecer en niveles relativamente bajos de Aw; a diferencia de la mayoría de las bacterias, que requieren Aw > 0.97, *Staphylococcus* puede crecer desde 0.83, si las demás condiciones son adecuadas. La mayoría de las cepas son tolerantes a altas concentraciones de azúcares y de sal, es decir que son halotolerantes y osmotolerantes. Es un microorganismo poco competitivo.

*Staphylococcus aureus* es importante en el campo de los alimentos, por dos razones:

- Por su capacidad de producir enterotoxinas termoestables.
- Porque es relativamente sensible a agentes sanitizantes y a los tratamientos más usados en la conservación de alimentos.

Por ello, su presencia se relaciona con mala higiene o sanitización deficiente de equipo y área de trabajo y/o con riesgo de intoxicación alimentaria. Como además es un microorganismo poco competitivo, su presencia en alimentos procesados indica contaminación postproceso, que generalmente proviene de humanos o de superficies contaminadas. A partir de ello, se desarrolla fácilmente en alimentos donde no hay competencia y/o hay deficiencias en el manejo. Por ejemplo, se han reportado que pequeñas diferencias en la temperatura de maceración y en el pH final de los productos causan incrementos importantes en el recuento de *S. aureus* en alimentos procesados (Cadavez y cols., 2016).

Varias especies de *Staphylococcus* pueden producir enterotoxinas termoestables que causan gastritis en los humanos. Las enterotoxinas estafilocóccicas (SE por sus siglas en inglés) se consideran el principal agente etiológico de intoxicaciones alimentarias, aún cuando muchas de ellas, por su origen doméstico y/o por afectar a un número relativamente bajo de personas, no son reportadas a los sistemas de vigilancia epidemiológica. Aunque las SE son antigénicas y la intoxicación remite en unos días, puede llegar a ser grave si no se atiende oportuna y adecuadamente.

La presencia de *Staphylococcus aureus* en alimentos, utensilios y/o superficies en contacto con alimentos, sin duda alguna, se relaciona con malas prácticas higiénicas. Sin embargo, no todas las cepas de esta especie producen enterotoxinas. Ésta puede determinarse directamente mediante ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Pero lo más fácil y frecuente es cuantificar *S. aureus* por gramo de alimento y determinar la capacidad de producción de toxina en una muestra de las colonias encontradas; esta capacidad toxigénica está fuertemente relacionada con la presencia de coagulasa y termonucleasa, en las cepas de *S. aureus*, por lo que se consideran toxigénicas las colonias que sean positivas a estas pruebas bioquímicas. En esta metodología, finalmente, se aplica el porcentaje de UFC toxigénicas encontradas en esa muestra, al número de UFC/g detectadas en el alimento.

Cabe señalar que el BAM reporta un 12% de error en la discriminación de cepas toxigénicas de *S. aureus* mediante pruebas bioquímicas, incluyendo además de las dos mencionadas, fermentación anaerobia de glucosa y manitol, así como

sensibilidad a la estafilolisina (peptidasa que hidroliza el peptidoglucano de la pared de *S. aureus*). Las SE son proteínas de cadena lineal, con PM de 26 a 29 kDa y son resistentes a las proteasas intestinales; sin embargo, hay algunos reportes de toxinas de estructura similar, producidas por *S. intermedius* y *S. hyicus*. La determinación de la enterotoxina estafilocócica se lleva a cabo mediante una prueba rápida (4 h) por inmunoensayo visual, basado en ELISA, en configuración de sándwich; tiene una sensibilidad de 1.0 ng/mL y es específica para la identificación de las enterotoxinas A-E, aunque no las identifica de forma individual. También se puede hacer mediante el kit TECRA™.

La FDA reporta en *Bad Bug Book* que la dosis de toxina estafilocócica necesaria para sufrir intoxicación es menor a 1.0 µg (microgramo) y que, en función de la sensibilidad del consumidor, pueden presentarse síntomas desde 100 a 200 ng (nanogramos) de la enterotoxina. Estas cantidades de toxina son fácilmente producidas por poblaciones de *S. aureus* a partir de 10<sup>5</sup> UFC/g.

Desde luego, cuando se detecta esta cantidad en el análisis microbiológico, es posible:

- que haya un número mayor, no detectado en el análisis;
- que la población aún crezca antes del consumo del alimento;
- que ya haya disminuido la población de *S. aureus*, lo que no se relaciona con la disminución de toxina ya producida.

Por ello, y porque su presencia sean o no cepas toxigénicas denota higiene deficiente, la mayoría de las normas, en el mundo entero, consideran un límite máximo para la presencia de este microorganismo en las especificaciones sanitarias de diversos alimentos. Y el límite es, generalmente, mucho menor a 10<sup>5</sup> UFC/g.

En México, por ejemplo, *S. aureus* está considerado en las especificaciones sanitarias de los siguientes alimentos:

**TABLA 8.1** Límite máximo de *Staphylococcus aureus* en diversos alimentos.

Alimento	<i>S. aureus</i> , máx. UFC/g	Referencia
Quesos frescos y de suero	≤ 1000	NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos.
Quesos madurados y procesados	≤ 100	
Productos de la pesca procesados. Todos.	≤ 1000	NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados.
Pan blanco, pan de harina integral y prod. de bollería	< 100	NOM-247-SSA1-2008, Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación.
Pan dulce y panqué	100	
Pasteles y pays con relleno o cobertura	100	
Panqués	100	
Hierbas para infusión o té	Negativo	Annex J. Summary of Current Food Standards. 04 April 2013. FDA, USA.
Pescado seco salado	< 1000	
Pescado ahumado	100	
Aceite virgen de coco	Negativo	
Harina de coco	Negativo	
Leche bronca	< 10 <sup>4</sup>	Guidance for FDA Staff. Compliance Policy Guide. Sec. 527.300 Dairy Products - Microbial Contaminants and APA (CPG 7106.08)
Alimentos <i>Ready To Eat</i>	< 20	Center for Food Safety. Microbiological Guidelines for RTE and specific Food. 2014. Hong Kong.
Bebidas no embotelladas	< 100	

La intoxicación es causada por la ingestión de SE ya formadas; es una gastritis que se presenta rápidamente, entre 1 y 7 horas después del consumo del alimento contaminado (lo que puede variar en función de susceptibilidad, ingestión total y estado general de salud). Generalmente es una intoxicación aguda, se presenta con diarrea y vómito, así como náusea y calambres abdominales y musculares, así como alteraciones de pulso y presión arterial. Es autolimitante, pero la deshidratación puede llevar a la necesidad de hospitalizar al paciente y a complicaciones graves.

En México, el método oficial para la determinación de *S. aureus* en alimentos estaba descrito en la Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos. Sin embargo, en la NOM-210-SSA1-2014. Productos y Servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores, que se publicó en el Diario Oficial el 23 de diciembre de 2015, se establece el nuevo método para esta determinación, en el Apéndice B Normativo. Método de referencia para la estimación de la cuenta de *S. aureus*, que entró en vigor el 18 de diciembre de 2016. La entrada en vigor del Apéndice Normativo B de la NOM 210-SSA1-2015, deja sin efectos a la NOM-115-SSA1-1994.

## **FUNDAMENTO**

La presente técnica para la detección de *Staphylococcus aureus* consiste en los siguientes pasos:

1. Aislamiento selectivo, se utiliza un medio selectivo sólido, el cual inhibe el desarrollo de géneros diferentes a *Staphylococcus*, pero además permite reconocer el desarrollo característico del microorganismo buscado.
2. Recuperación de la cepa, este paso permite restaurar las células dañadas de *Staphylococcus aureus*.
3. Identificación bioquímica, en este punto se identifica el género y especie de los microorganismos previamente aislados y sospechosos de ser *S. aureus* enterotoxigénico.

## **MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES**

- 6-8 cajas de Petri con medio agar Baird Parker.<sup>a</sup>
- 10 tubos con 0.5 mL de caldo BHI.<sup>b</sup>
- 1 matraz con 90 mL de solución reguladora de fosfatos, agua peptonada o solución salina isotónica.<sup>a</sup>
- 2 o 3 tubos con 9 mL de solución reguladora de fosfatos, agua peptonada o solución salina isotónica.<sup>a</sup>
- 1 caja de Petri con agar azul de toluidina-ADN o agar DNA.<sup>c</sup>
- 10 tubos con caldo rojo de fenol adicionado con 0.5% de glucosa.<sup>c</sup>

- 10 tubos con caldo rojo de fenol adicionado con 0.5% de manitol.<sup>c</sup>
- 10 tubos con agar triptona soya inclinado.<sup>b</sup>

### **SOLUCIONES, REACTIVOS E INDICADORES**

- Aceite de parafina o mineral estéril.<sup>c</sup>
- Plasma de conejo con EDTA como anticoagulante.<sup>c</sup>
- Reactivos para la tinción de Gram.<sup>b</sup>
- Si no se tiene el agar azul de toluidina-DNA, utilizar agar DNA y como revelador una solución de orto toluidina 0.1 M o bien una solución de ácido clorhídrico 1N.<sup>d</sup>
- Solución de peróxido de hidrógeno al 3%.<sup>c</sup>

### **MATERIAL Y EQUIPO**

- Asa bacteriológica.<sup>b, c</sup>
- Balanza granataria.<sup>a</sup>
- Bolsas para Stomacher®.<sup>a</sup>
- Cuchillos, pinzas, tijeras cucharas, espátulas.<sup>a</sup>
- Gradilla.<sup>a, b, c</sup>
- Homogeneizador peristáltico tipo Stomacher® o licuadora.<sup>a</sup>
- Incubadora capaz de operar a  $36 \pm 1$  °C.<sup>a, b, c</sup>
- Mechero.<sup>a, b, c</sup>
- Microscopio óptico.<sup>b, c</sup>
- Pipetas de 1 mL estériles o, en dado caso de contar con ella, una micropipeta de 100-1000 µL con puntas estériles.<sup>a</sup>
- Pipetas Pasteur estériles.<sup>c</sup>
- Portaobjetos.<sup>b, c</sup>
- Propipeta (en caso de no tener micropipeta).<sup>a</sup>
- Tripié y charola o parrilla de calentamiento.<sup>c</sup>
- Varillas de vidrio de 3.5 mm de diámetro aproximadamente y 20 cm de largo dobladas en ángulo recto o equivalente.<sup>a</sup>

## NOTAS

- <sup>a</sup> Material necesario al inicio de la práctica.
- <sup>b</sup> Material necesario a las 48 h de iniciada la práctica.
- <sup>c</sup> Material necesario a las 72 h de iniciada la práctica.
- <sup>d</sup> Material necesario a las 96 h de iniciada la práctica.

## PROCEDIMIENTO

### 1. Aislamiento selectivo

- Pesar en zona aséptica 10 g de la muestra en una bolsa para Stomacher®.
- Adicionar 90 mL de solución reguladora de fosfatos, agua peptonada o solución salina isotónica.
- Homogenizar 30 segundos a velocidad media en el Stomacher®.
- Realizar diluciones decimales hasta  $10^{-3}$  (el número de diluciones está en función del origen de la muestra).
- Transferir por medio de una micropipeta o pipeta estéril 0.1 mL de la muestra directa si es líquida, o bien, 0.1 mL de la dilución inicial ( $10^{-1}$ ). En el caso de otros productos, por duplicado a cajas conteniendo agar Baird Parker. Repetir el procedimiento para las diluciones siguientes si son necesarias  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ . Si se sospecha que el alimento contiene bajas cuentas de *S. aureus*, se deberá aumentar el límite de detección en un factor igual a 10, inoculando 1 mL de la muestra directa si ésta es líquida, o de cada dilución distribuida en 3 placas como sigue: 0.4 mL, 0.3 mL y 0.3 mL (en total 1 mL) sobre la superficie de las placas de agar Baird Parker, por duplicado.
- Cuidadosamente distribuir el inóculo tan pronto como sea posible sobre la superficie del agar, utilizando varillas estériles de vidrio en ángulo recto, una para cada placa y dilución, o en su defecto flamear la varilla con alcohol y al mechero entre cada una de las diluciones.
- Mantener las placas con las tapas hacia arriba hasta que el inóculo sea absorbido totalmente por el agar.
- Invertir las placas e incubar a  $36 \pm 1$  °C por  $24 \pm 2$  h. Marcar en la base de la placa la posición de las colonias típicas y atípicas, re-incubar por  $24 \pm 2$  h a  $36 \pm 1$  °C, marcar en la base de la placa la posición de las nuevas colonias típicas y atípicas.

Colonias típicas: colonias negras o grises, circulares, brillantes, convexas, lisas de diámetro de 1 mm a 1.5 mm a las 24 h de incubación y 1.5 mm a 2.5 mm después de 48 h de incubación, rodeadas por una zona clara que puede ser parcialmente opaca. Después de 24 h, en esas zonas claras, se puede observar un halo opalescente en la periferia de las colonias.

Colonias atípicas: son colonias de las mismas dimensiones que las colonias típicas, pueden ser negras brillantes con o sin un pequeño borde blanco, la zona clara es muy pequeña o no visible y el halo opalescente no está o es apenas visible.

También son colonias atípicas las colonias grises sin zona clara, del mismo tamaño que las colonias típicas. Hay bacterias de géneros distintos al *Staphylococcus*, que pueden dar la morfología colonial típica o atípica, por lo que la observación microscópica usando una tinción de Gram puede ayudar en la distinción del género.

En algunas ocasiones las cepas que han sido aisladas de productos congelados o deshidratados, que han sido almacenados por períodos largos de tiempo, frecuentemente desarrollan colonias menos negras con apariencia rugosa y textura seca.

## 2. Recuperación de la cepa

- Seleccionar las placas que tengan entre 15 y 150 colonias típicas y atípicas de *S. aureus*; si no es posible, seleccionar las placas de las diluciones más altas, no obstante tengan más de 150 colonias. Seleccionar por muestra 5 colonias típicas para su confirmación o 5 colonias atípicas, para la realización de la tinción de Gram.
- Realizar a todas las colonias seleccionadas una tinción de Gram. En el caso de observar bacilos positivos, la colonia se tomará como negativa para *S. aureus*, por lo contrario, si se observan cocos se continuará con su confirmación.

Si fue inoculado 1.0 mL en 3 placas (0.4 mL, 0.3 mL y 0.3 mL = 1.0 mL), tratar éstas como una sola y seguir los procedimientos de confirmación.

- Sembrar cada colonia típica o atípica, según sea el caso, en tubos conteniendo 0.5 mL de caldo BHI y en tubos con agar triptona soya (AST). Incubar los tubos de caldo BHI a  $35 \pm 1$  °C, en baño de agua, durante 20 a 24 h. Mantener los cultivos de AST a no más de  $27 \pm 1$  °C para pruebas posteriores.
- Utilizar simultáneamente un control positivo de *S. aureus* y un control negativo de *S. epidermidis*.

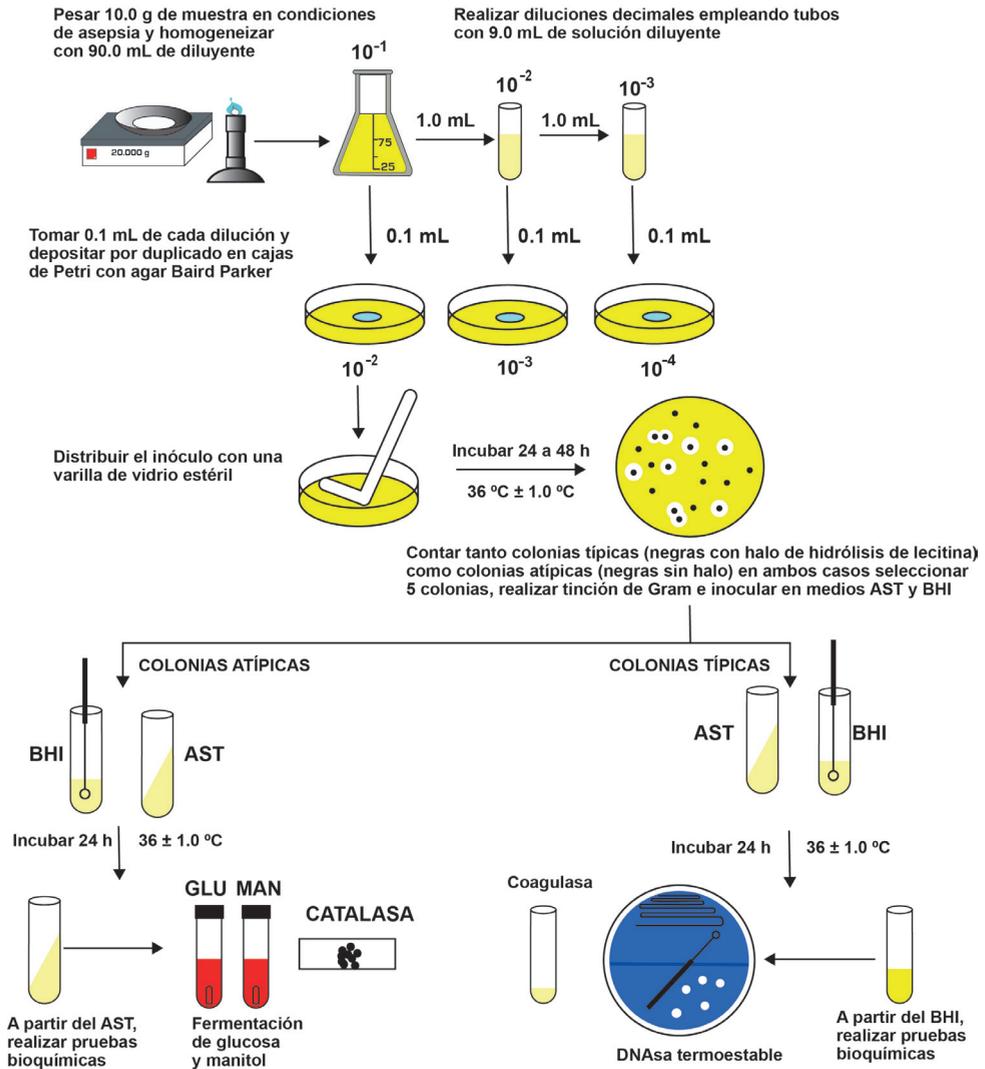


Figura 8.1 Determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.

### 3. Pruebas bioquímicas

Las pruebas que se describen más adelante deben de realizarse para cada una de las colonias recuperadas en el paso anterior, considerando que las pruebas oficiales para la determinación de *S. aureus* enterotoxigénico son la presencia de la enzima coagulasa y la termonucleasa y se consideran pruebas auxiliares o complementarias las pruebas de fermentación anaerobia de manitol y glucosa, así como la prueba de catalasa.

#### 3.1 Prueba de la presencia de la enzima coagulasa

- Agregar 0.1 mL del cultivo proveniente de caldo BHI a 0.3 mL de plasma de conejo con EDTA. Incubar a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  en baño de agua y observar periódicamente a intervalos de 1 h durante las primeras 4 a 6 h; si no hay formación de coágulo, observar hasta las 24 h. Considerar la prueba positiva cuando el coágulo se forma completamente y es firme al invertir el tubo.
- Para cada lote nuevo de reactivo se deberá realizar la prueba de coagulabilidad del plasma de conejo, añadiendo una gota de cloruro de calcio al 5% a 0.5 mL de plasma reconstituido, formándose un coágulo en 10 a 15 s.

#### 3.2 Prueba de la enzima termonucleasa

- Preparar un portaobjetos con 3 mL de agar azul de toluidina-ADN. Con ayuda de una pipeta Pasteur hacer orificios equidistantes en el agar.
- En un baño de agua hirviendo calentar durante 15 min, 0.3 mL de cultivo en BHI. Auxiliándose de una pipeta Pasteur o de una micropipeta, transferir una gota del cultivo de BHI calentado, a un orificio del medio de agar azul de orto toluidina, repetir para cada cepa seleccionada, incluyendo testigos positivo y negativo.
- Incubar a  $35 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  en cámara húmeda de 4 a 24 h. La aparición de un halo color rosa extendido de por lo menos 1 mm alrededor de la perforación califica como positiva la prueba.

En caso de no contar con el agar azul de toluidina-ADN se puede usar agar DNA y revelar con HCl 1N, una prueba positiva se observa con un halo transparente alrededor de donde se colocó la muestra.

### 3.3 Prueba de la catalasa

- A partir de un cultivo en AST realizar la prueba de la catalasa en un portaobjetos, suspender una porción del cultivo con una gota de peróxido de hidrógeno al 3%. La producción de burbujas indica la presencia de la enzima catalasa y consecuentemente una prueba positiva.

### 3.4 Prueba de la utilización anaeróbica del manitol

- A partir de cada cultivo de AST, sembrar con un inóculo abundante un tubo con caldo rojo de fenol adicionado de manitol al 0.5%. Cubrir el caldo con una capa de aceite de parafina o aceite mineral de al menos 25 mm. Incubar  $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  de 24 h hasta 5 días. Un cambio en la coloración del indicador refiere la utilización anaeróbica del manitol y la presencia de *S. aureus*. Incluir controles positivos y negativos.

### 3.5 Prueba de la utilización anaeróbica de la glucosa

- A partir de cada cultivo de AST, sembrar con un inóculo abundante un tubo con caldo rojo de fenol adicionado con glucosa al 0.5%. Cubrir el caldo con una capa de aceite de parafina o aceite mineral de al menos 25 mm. Incubar  $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  de 24 h hasta 5 días. Un cambio en la coloración del indicador refiere la utilización anaeróbica del manitol y la presencia de *S. aureus*. Incluir controles positivos y negativos.
- Si se dispone de un sistema de *bioquímicas miniaturizado*, éste puede ser utilizado como alternativa de las pruebas bioquímicas secundarias; no así de la tinción de Gram, coagulasa y termonucleasa.

**TABLA 8.2** Características de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *Micrococcus* sp.

	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Micrococcus</i>
Catalasa	+	+	+
Coagulasa	+	-	-
Termonucleasa	+	-	-
Utilización anaeróbica de glucosa	+	+	-
Utilización anaeróbica de manitol	+	-	-

+ La mayoría de las cepas son positivas (más del 90%).

- La mayoría de las cepas son negativas (más del 90%).

**CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS**

- Considerar para los cálculos y expresión de resultados las colonias seleccionadas y confirmadas, es decir, que fueron positivas para las pruebas de coagulasa y/o termonucleasa. Si al menos el 80% de las colonias típicas seleccionadas fueron coagulasa positiva y/o termonucleasa positiva, tomar el número total de las colonias contadas como presuntivas de *S. aureus*.
- En otros casos, calcular el número de colonias presuntivas de *S. aureus* a partir del porcentaje obtenido de colonias coagulasa y/o termonucleasa positivas confirmadas.
- Promediar los resultados de los duplicados.
- Cuando en dos diluciones consecutivas se obtienen cuentas entre 15 y 150 colonias (típicas o atípicas) calcular el número de *S. aureus* para cada dilución como se especifica en los puntos anteriores, calcular la cuenta de *S. aureus* considerando el factor de dilución, calcular el logaritmo en base diez de cada dilución y realizar la resta de éstos, si la diferencia entre los logaritmos de las dos diluciones es menor a 0.3, reportar el promedio de las dos diluciones. Si por el contrario, la diferencia entre los logaritmos es mayor a 0.3, reportar el valor más bajo.
- Para la expresión final, redondear el resultado obtenido a un número entero utilizando dos cifras significativas.
- Cuando no se tenga crecimiento en las placas o las pruebas bioquímicas de las colonias seleccionadas hayan sido negativas, reportar el número de *S. aureus* por g o mL considerando la sensibilidad mínima de cuantificación del método, quedando de la siguiente manera:

**TABLA 8.3** Sensibilidad del método.

Dilución de la muestra	Volumen inoculado	Resultado
<b>Muestra directa</b>	1 mL = (0.4 mL, 0.3 mL y 0.3 mL)	< 1 UFC/mL
<b>Muestra directa</b>	0.1 mL	< 10 UFC/mL
<b>10<sup>-1</sup></b>	1 mL = (0.4 mL, 0.3 mL y 0.3 mL)	< 10 UFC/g o mL
<b>10<sup>-1</sup></b>	0.1 mL	< 100 UFC/g o mL

**Ejemplo:** el 0.1 mL del inóculo de la dilución  $10^{-2}$  de la muestra da como resultado 65 y 85 colonias típicas por placa.

Ninguna colonia atípica fue identificada en las placas.

Todas las 5 colonias seleccionadas de la placa conteniendo 65 colonias fueron coagulasa y termonucleasa positiva, por lo que las 65 colonias fueron consideradas como *S. aureus*.

3 de las 5 colonias seleccionadas de la placa que contiene 85 colonias fueron coagulasa y termonucleasa positiva, por lo que el 60%, es decir, 51 colonias son consideradas como *S. aureus*.

La cuenta promedio tomando en consideración solo las positivas es:  $65+51/2 = 58$  *S. aureus*.

58 por el inverso del factor de dilución ( $1/10^{-2}$ ) es 5800 UFC.

Si se considera que el inóculo fue de 0.1 mL, habrá que multiplicar por 10 para obtener 58000 UFC/mL o g, según la naturaleza de la muestra.

Expresando en dos cifras significativas  $58 \times 10^3$  UFC/mL o g.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Bennet R.W. & Lancette G.A. (2011). *Bacteriological Analytical Manual Chapter 12 Staphylococcus aureus*. U.S. Food and Drug Administration. USA. Bennett, R.W. & J.M. Hait. (2011). *Bacteriological Analytical Manual Chapter 13-A. Staphylococcal Enterotoxins: Micro-slide Double Diffusion and ELISA-based Methods*. U.S. Food and Drug Administration. USA. Recuperado el 5 de septiembre de 2016 de <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm073674.htm>.
- Cadavez V., Gonzales-Barron U., Pires P., Fernandes E., A.P., A., Araujo J.P., Lopes-da-Silva F., Rodrigues P., C., M.J., F. & Dias, T. (2016). An assessment of the processing and physicochemical factors contributing to the microbial contamination of *salpicão*, a naturally-fermented Portuguese sausage. *LWT - Food Science and Technology*, 72: 107-116. doi:10.1016/j.lwt.2016.04.038.

- Food and Drug Administration (2012). *Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Staphylococcus aureus*. 2<sup>nd</sup> Edition. pp. 87-91. Recuperado el 5 de septiembre de 2016 de [www.fda.gov/downloads/Food/FoodbornellnessContaminants/UCM297627.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodbornellnessContaminants/UCM297627.pdf).
- FDA. Guidance for FDA Staff. Compliance Policy Guide. Sec. 527.300. *Dairy Products. Microbial Contaminants and Alkaline Phosphatase Activity*. U.S. Food and Drug Administration. Recuperado el 5 de septiembre de 2016 de [www.fda.gov/downloads/iceci/compliancemanuals/compliancepolicyguidancemanual/ucm192468.pdf&usg=afqjcnemj52dui8lw1oapqxqdvboq7nutg](http://www.fda.gov/downloads/iceci/compliancemanuals/compliancepolicyguidancemanual/ucm192468.pdf&usg=afqjcnemj52dui8lw1oapqxqdvboq7nutg).
- Secretaría de Salud (2014). Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014. Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Apéndice B Normativo. Método de referencia para la estimación de la cuenta de *S. aureus*. Diario Oficial de la Federación, 26 junio 2016. México. Recuperado el 26 junio de 2016 de [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015).

# 9

## Detección de *Salmonella* spp. en alimentos

---

### OBJETIVOS

- Aplicar adecuadamente la técnica descrita en la NOM-210-SSA1-2014 para la detección del género *Salmonella* en diferentes alimentos.
- Explicar el fundamento de todas las etapas de la detección de *Salmonella* en alimentos.
- Interpretar los resultados del análisis y sus implicaciones en la calidad del alimento.
- Reportar correctamente el análisis para la detección de este microorganismo de acuerdo con la legislación vigente.

### GENERALIDADES

En los inicios del siglo XIX en Francia, patólogos clínicos documentaron la asociación de una ulceración intestinal humana con un agente contagioso, denominando a esta enfermedad como fiebre tifoidea, más tarde investigadores europeos aislaron y caracterizaron al bacilo responsable de dicha enfermedad; en el mismo siglo en Estados Unidos, Salmon y Smith aislaron de la carne de cerdo a un microorganismo que llamaron *Bacillus choleraesuis*, actualmente conocido como *Salmonella entérica* serovar Choleraesuis.

La infección causada por *Salmonella* en seres humanos puede originar varias condiciones clínicas como la fiebre entérica (tifoidea), enterocolitis e infecciones sistémicas por microorganismos no tifoideas. Las infecciones en humanos por cepas de *Salmonella* no tifoideas, generalmente, se presentan después de un período de incubación de 8 a 72 horas. Es común que estas infecciones originen una enfermedad autolimitante. Durante los primeros 5 días a partir del inicio, se producen evacuaciones diarreicas no sanguinolentas y dolor abdominal. Los casos sin complicaciones únicamente requie-

ren terapia de soporte, como rehidratación con electrolitos. No se emplean antibióticos ya que prolongan el estado de portador. Las infecciones por cepas no tifoideas pueden llegar a originar infecciones sistémicas y condiciones crónicas (artritis reactiva séptica, síndrome de Reiter y espondilitis anquilosante).

La fiebre entérica es una infección grave asociada con las cepas tifoidea y paratifoidea, las cuales están muy bien adaptadas para invadir y sobrevivir en los tejidos de hospederos humanos. La sintomatología inicia después de un periodo de incubación de 7 a 28 días y pueden presentarse diarrea, fiebre prolongada e intermitente, dolor abdominal, dolor de cabeza y abatimiento. El diagnóstico se realiza a partir del aislamiento del agente infeccioso a partir de la sangre o muestras de orina en las primeras etapas de la enfermedad, o a partir de heces en las etapas más severas. Para este cuadro de fiebre entérica tifoidea se aplican terapia de soporte y/o antibióticos como cloranfenicol, ampicilina o trimetoprim-sulfametoxazol, aunque se ha observado un incremento en la resistencia a antibióticos de las cepas causantes.

La ingesta de pocas células de *Salmonella* puede generar la infección, se estima que puede originarse con menos de 10 células o hasta  $10^{11}$  UFC/g. Esta dosis infectiva no sólo depende de la virulencia de las cepas y de la heterogeneidad inmunológica de los seres humanos, sino también de la composición química del alimento contaminado. Un denominador común asociado con dosis infectivas bajas es un alto contenido de grasa en el alimento (por ejemplo, manteca de cocoa en chocolate, leche con alto contenido de grasa en queso, y grasa animal en la carne). *Salmonella* puede quedar atrapada en las micelas de lípidos y protegerse contra la acción bactericida de la acidez gástrica.

Los recién nacidos, infantes y personas de la tercera edad son más susceptibles a la infección respecto a adultos sanos. La colonización intestinal y distribución sistémica de este microorganismo se facilita con el desarrollo incompleto del sistema inmune en recién nacidos e infantes, así como el abatimiento en la respuesta inmunológica en individuos de la tercera edad, además de la baja producción de ácidos gástricos en estos sectores de la población.

La amplia distribución de *Salmonella* spp. en el medio ambiente enmascara la importancia de los productos cárnicos de cerdo, res y cordero, así como de leche y derivados como vehículos de infección. Los factores que contribuyen a su permanencia son las prácticas utilizadas en la industria cárnica, pesquera, de moluscos, láctea y el reciclaje de la materia prima como alimento para ganado, lo que ha favorecido la continua permanencia de este patógeno humano en la

cadena alimenticia. El sector avícola se sitúa como la principal fuente del microorganismo, incluso se relaciona al microorganismo con pandemias asociadas a la ingesta de huevo, debido a la transmisión transovárica.

Las frutas y verduras han ganado notoriedad en años recientes por ser fuentes de salmonelosis humana, este fenómeno se presenta por varios factores como la fertilización de sembradíos con lodos sin tratamiento o efluentes de drenajes potencialmente contaminados con esta bacteria que presenta resistencia a varios antibióticos; la irrigación de los campos y el lavado de frutas y verduras con aguas contaminadas, la manipulación excesiva de los alimentos por los individuos, la exposición a la contaminación ambiental de especias y condimentos durante el secado, además de la resistencia que presentan estos microorganismos a valores de pH bajos.

Este microorganismo se identificó inicialmente en hospitales y laboratorios clínicos, los métodos empleados para su detección se adaptaron posteriormente al análisis de alimentos. Las modificaciones de estos métodos tomaron en cuenta, por un lado, el daño a las células bacterianas presentes debido al proceso al que se somete el alimento; por ejemplo, tratamiento térmico, secado, etc. Por otro lado, se tomó también en cuenta la variabilidad inherente a la naturaleza del producto en estudio.

Existen distintos protocolos para aislar *Salmonella* de acuerdo con los diferentes tipos de alimentos, sin embargo, todos ellos son esencialmente similares en principio, empleando etapas de preenriquecimiento, enriquecimiento selectivo, aislamiento en medios de cultivo selectivos y diferenciales, identificación bioquímica y confirmación serológica.

*Salmonella* spp. pertenece a la familia de las *Enterobacteriaceae*, es un bacilo Gram-negativo anaerobio facultativo, se desarrolla en condiciones óptimas a 37 °C, tienen flagelos peritricos; sin embargo, existen variantes no móviles, ya sea porque no tienen flagelos o porque éstos son disfuncionales. Como ejemplo de los primeros está *S. enterica* serovar Pullorum y Gallinarum, un microorganismo quimioorganótrofo que metaboliza nutrientes por las vías fermentativa y respiratoria, cataboliza la D-glucosa y otros carbohidratos produciendo ácido y gas. Crece en citrato como única fuente de carbono, generalmente produce ácido sulfhídrico, descarboxila la lisina y la ornitina. Por otra parte, es oxidasa y catalasa-negativo, no hidroliza la urea y no metaboliza la sacarosa.

El género *Salmonella* se caracteriza por fermentar la glucosa con producción de acidez y gas en el medio de agar 3 azúcares (TSI), pero es incapaz de metabolizar la lactosa y sacarosa de este medio o en medios selectivos como verde

brillante, xilosa lisina desoxicolato o entérico de Hektöen. En general, es característica su capacidad para descarboxilar la lisina generando alcalinidad al medio por producción de cadaverina.

Es importante resaltar la variabilidad genética que presenta este microorganismo debido a mutaciones, intercambio intra e intergenérico de plásmidos; estos fenómenos han reducido los biotipos que son característicos de *Salmonella*. En muestras tanto clínicas como de alimentos, se han encontrado biotipos que fermentan la lactosa y la sacarosa que pueden hidrolizar la urea, que producen indol y se desarrollan en cianuro de potasio, también existen biotipos que no descarboxilan la lisina; este fenómeno ha ocasionado una reevaluación del esquema de identificación de este género, induciendo a utilizar nuevas tecnologías como las moleculares.

De acuerdo con la normatividad, la identificación bioquímica de *Salmonella* se realiza junto con la confirmación serológica, la cual está basada en reacciones de aglutinación antígeno-anticuerpo. Los antígenos de este género se clasifican en: lipopolisacáridos (LPS), somáticos (O) que se localizan en la superficie externa de la membrana, los flagelares (H) y el antígeno capsular (Vi), este último se encuentra presente sólo en *Salmonella* serovar Typhi, Paratyphi y Dublin.

## **FUNDAMENTO**

La técnica para detectar *Salmonella* se basa en cinco etapas básicas:

- **Preenriquecimiento.** En donde a la muestra se le adicionan nutrientes importantes que se localizan en un medio nutritivo no selectivo, que permite restaurar las células dañadas de *Salmonella*, logrando de esta manera una condición fisiológica estable.
- **Enriquecimiento selectivo.** Se logra a partir de un medio de cultivo que conjunte dos condiciones: por un lado, debe incrementar la población de *Salmonella* y, por otro, inhibir otros microorganismos presentes en la muestra.
- **Aislamiento en medios de cultivo selectivos y diferenciales.** Este punto se deriva directamente del anterior, por tal razón se utilizan medios de cultivo selectivos, que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a *Salmonella* y que a la vez permiten el reconocimiento visual característico de colonias de este género.
- **Identificación bioquímica.** Se realiza la identificación genérica y, en ocasiones, de especies de los cultivos de *Salmonella*, así como de otros géneros.

- **Confirmación serológica.** Se logra la identificación específica de un microorganismo mediante una técnica inmunológica (antígeno-anticuerpo).

### **MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES**

- 1 matraz Erlenmayer de 500 mL con 225.0 mL de agua peptonada amortiguada.<sup>a</sup>
- 1 tubo de ensayo con 10.0 mL de caldo RVS (Rappaport-Vasiliadis-Soya-Peptona).<sup>b</sup>
- 1 tubo de ensayo con 10.0 mL de caldo MKTTn (Muller-Kauffmann-Tetrionato-novobiocina).<sup>b</sup>
- 2 cajas de Petri con agar XLD (Xilosa-Lisina-Desoxicolato).<sup>c</sup>
- 2 cajas de Petri con agar SB (agar sulfito de bismuto; ASB).<sup>c</sup>
- 2 cajas de Petri con agar entérico Hektöen (HE).<sup>c</sup>
- 2 cajas de Petri con agar Salmonella-Shigella (SS).<sup>c</sup>
- 2 cajas de Petri con agar verde-brillante (VB).<sup>c</sup>
- 3 cajas de Petri con agar nutritivo.<sup>d</sup>
- 3 tubos de ensayo con 3.5 mL de agar hierro triple azúcar (TSI).<sup>e</sup>
- 3 tubos de ensayo con 3.5 mL de agar hierro lisina (LIA).<sup>e</sup>
- 3 tubos de ensayo con 3.5 mL de agar urea de Christensen.<sup>f</sup>
- 3 tubos de ensayo con 3.5 mL de caldo L-lisina descarboxilasa.<sup>f</sup>
- 3 tubos de ensayo con 3.5 mL de caldo triptona.<sup>f</sup>
- 3 tubos de ensayo con 3.5 mL de caldo RMVP (rojo de metilo-Voges-Proskauer).<sup>f</sup>
- 3 tiras comerciales API 20E o 3 tarjetas VITEK.<sup>f</sup>

### **SOLUCIONES, REACTIVOS E INDICADORES**

- Novobiocina 0.8% esterilizada por filtración.<sup>b</sup>
- Yodo-yoduro de potasio.<sup>b</sup>
- Juego de colorantes para tinción de Gram.<sup>d, e</sup>
- Aceite de inmersión.<sup>d, e</sup>
- O-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosido o discos reactivos para prueba de  $\beta$ -galactosidasa.<sup>f</sup>

- 3 tubos de ensayo con 0.25 mL de solución salina isotónica.<sup>f</sup>
- 1 tubo de ensayo con 0.5 mL de solución salina isotónica estéril.<sup>f</sup>
- 1 tubo de ensayo con 0.5 mL de antisuero polivalente O para *Salmonella*.<sup>f</sup>

### **MATERIAL Y EQUIPO**

- Balanza granataria.<sup>a</sup>
- Bolsas para Stomacher®.<sup>a</sup>
- Homogeneizador peristáltico tipo Stomacher® o licuadora.<sup>a</sup>
- Cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas estériles.<sup>a</sup>
- Gradilla.<sup>b, c, d</sup>
- Pipetas de 1 mL estériles o micropipeta de 100-1000 µL con puntas estériles.<sup>b</sup>
- Propipeta (en caso de no tener micropipeta).<sup>a</sup>
- Incubadora capaz de operar a  $36 \pm 1$  °C.<sup>a, b, c, d, e, f</sup>
- Incubadora capaz de operar a  $41.5 \pm 1$  °C.<sup>b</sup>
- Asa bacteriológica.<sup>c, d, e, f</sup>
- Refrigerador capaz de operar entre 4 a 8 °C.<sup>c, d</sup>
- Mechero.<sup>a, b, c, d, e, f</sup>
- Microscopio óptico.<sup>d, e</sup>
- Pipetas Pasteur estériles.<sup>f</sup>
- Portaobjetos.<sup>d, e, f</sup>

### **NOTAS**

<sup>a</sup> Material necesario al inicio de la práctica.

<sup>b</sup> Material necesario a las 24 h de iniciada la práctica.

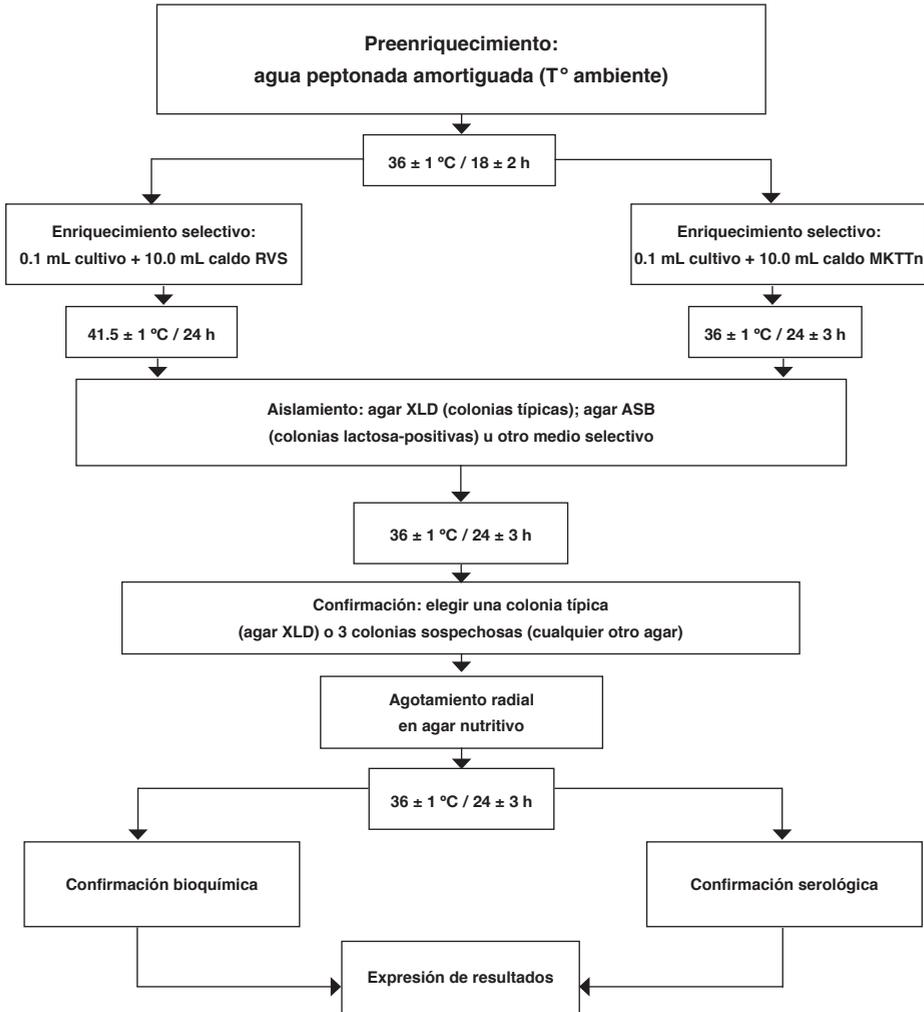
<sup>c</sup> Material necesario a las 48 h de iniciada la práctica.

<sup>d</sup> Material necesario a las 72 h de iniciada la práctica.

<sup>e</sup> Material necesario a las 96 h de iniciada la práctica.

<sup>f</sup> Material necesario a las 120 h de iniciada la práctica.

**DIAGRAMA GENERAL**



**Figura 9.1** Procedimiento general para la determinación de *Salmonella* spp. en alimentos.

## **PROCEDIMIENTO**

### **Preenriquecimiento general**

La presente metodología considera los lineamientos generales para la preparación y análisis de las muestras para la detección de *Salmonella* spp. en alimentos de acuerdo con el Apéndice Normativo A contenido en la NOM-210 (**Figura 9.1**). No se contemplan procedimientos alternativos de preenriquecimiento para muestras de alimentos específicas, por lo que se recomienda consultar la NOM-210 para dichos protocolos.

- Pesar asépticamente 25.0 g de la muestra dentro de una bolsa de Stomacher®.
- Adicionar 225.0 mL de agua peptonada amortiguada (medio de preenriquecimiento), para obtener una dilución 1/10.

En el caso de que se requieran analizar más de 25.0 g de un lote específico del alimento, se pueden analizar muestras compuestas, siempre que exista evidencia de que al mezclar dichas porciones no se afecta el resultado. Por ejemplo, se pueden analizar 10 muestras de 25.0 g para obtener 250.0 g y se deberá diluir con 2.25 L de medio de preenriquecimiento precalentado a  $36 \pm 1$  °C (esto deberá aplicarse para cualquier volumen grande de medio de preenriquecimiento).

- Homogeneizar en Stomacher® 30 s a velocidad media.
- Verter el contenido a un matraz Erlenmeyer estéril de 500 mL en condiciones de asepsia.
- Incubar a  $36 \pm 1$  °C durante  $18 \pm 2$  h.

### **Enriquecimiento selectivo**

- Agitar el matraz donde se realizó el preenriquecimiento para homogeneizar.
- Transferir 0.1 mL del cultivo preenriquecido a un tubo con 10.0 mL de caldo RVS.
- Transferir 1.0 mL del cultivo preenriquecido a un tubo con 10.0 mL de caldo MKTTn.
- En el caso de que se hayan pesado 250.0 g de la muestra durante el preenriquecimiento, se deberán inocular 1.0 y 10.0 mL en 100.0 mL de los caldos RVS y MKTTn.

- Agitar ambos tubos para homogenizar.
- Incubar el caldo RVS a  $41.5 \pm 1$  °C durante  $24 \pm 3$  h y el caldo MKTTn a  $36 \pm 1$  °C por  $24 \pm 3$  h.

### Aislamiento e identificación

- Agitar los tubos del enriquecimiento selectivo incubados para homogenizar.
- Tomar 1 asada a partir de cada medio de cultivo enriquecido y e inocular para obtener colonias aisladas (se recomienda la técnica de agotamiento en estría radial), en los siguientes medios sólido-selectivos diferenciales:
  - Agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD), para el aislamiento de colonias típicas.
  - Agar sulfito de bismuto (ASB), para el aislamiento de colonias lactosa-positivas.
  - Cualquier otro medio selectivo sólido complementario (a elección). Se puede elegir el agar entérico Hektöen (EH), agar verde brillante (VB), entre otros agares cromogénicos.

En total, deberán inocularse al menos tres medios selectivos diferenciales distintos, pero deberá emplearse dentro de ellos el agar XLD.

- Incubar el agar XLD a  $36 \pm 1$  °C durante  $24 \pm 3$  h.
- Incubar el resto de los medios sólidos selectivos diferenciales bajo las condiciones recomendadas por los fabricantes.
- Observar las características macroscópicas de las colonias en los medios sólidos selectivos.
- Seleccionar al menos una colonia típica de cada medio selectivo (cuando existan epidemias se deberán evaluar cinco colonias), de acuerdo con las características específicas de desarrollo en cada uno de los medios, las cuales se describen en el **Cuadro 9.1**. De no existir al menos una colonia típica de cada medio, evaluar al menos tres en total.
- En caso de no encontrar colonias típicas, proceder para evaluar dos colonias con morfología atípica de cada medio para el microorganismo, las cuales se describen en el **Cuadro 9.2**.
- Realizar una tinción de Gram para cada colonia seleccionada.
- Almacenar las placas con medios selectivos en refrigeración de 2 a 8 °C, por si es necesario tomar más colonias.

Algunas cepas de *Salmonella* spp. muestran un comportamiento bioquímico diferente al resto del género; por ejemplo, *S. Paratyphi* A al crecer en XLD genera colonias rosas con el centro más oscuro y no produce H<sub>2</sub>S. Otras salmonelas atípicas producen ácido a partir de la lactosa y al crecer en XLD dan colonias amarillas con o sin el centro negro.

Durante esta etapa del análisis se deberán trabajar cultivos control de cepas que ayuden a dar una mayor seguridad en los resultados, pues permiten el contraste o la referencia de las pruebas. Se debe utilizar como control a *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, también se usan controles atípicos como *S. diarizonae* (lactosa positivo), *S. Abortus-equi* ATCC 9842 (sulfhídrico negativo).

### **Purificación**

- A partir de cada colonia típica, o bien, atípica seleccionada, realizar un aislamiento en agar nutritivo.
- Incubar a  $36 \pm 1$  °C durante  $24 \pm 3$  h.
- Realizar una tinción de Gram para verificar la pureza y proceder a la comprobación bioquímica preliminar.

**CUADRO 9.1** Colonias típicas de *Salmonella* spp. en medios sólidos selectivos.

Medio selectivo	Color antes de la inoculación	Características coloniales de <i>Salmonella</i> spp.
<b>Agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD)</b>	Claro, color rojo brillante	Rosas o rojas pueden ser transparentes, con centro negro. En algunos casos completamente negras.
<b>Agar sulfito bismuto (ASB)</b>	Opaco, verde pálido	Café, grises o negras; con o sin brillo metálico. Algunas veces presencia de halo café o negro. <sup>1</sup>
<b>Agar entérico Hektöen (HE)</b>	Oscuro, color verde	Verdes o azul verdes con centro negro. En algunos casos completamente negras.
<b>Agar Verde Brillante (VB)</b>	Oscuro, color marrón	Rosas o rojas pueden ser transparentes, rodeadas de medio enrojecido. Las bacterias fermentadoras de lactosa son amarillas.
<b>Agar para <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> (SS)</b>	Claro, color rosa	Translúcidas, en ocasiones opacas. Algunas con centro negro. Las colonias fermentadoras de lactosa son rojas.

<sup>1</sup> Después de incubarse a  $36 \pm 1$  °C durante 24 o hasta  $48 \pm 3$  h, algunas colonias pueden presentar brillo metálico. El medio circundante a la colonia generalmente es café al principio y, con tiempos más prolongados de incubación, pueden aparecer de color negro. Si después de  $24 \pm 2$  h de incubación son color negro, seleccionar al menos una colonia. En caso de no observar colonias típicas en este tiempo, re-incubar las placas de ASB, otras  $24 \pm 3$  h. Después de  $48 \pm 2$  h de incubación, seleccionar si están presentes, al menos 1 colonia típica. Si las colonias seleccionadas no dan reacciones típicas en TSI y LIA, el cultivo se considera como negativo a *Salmonella* spp.

**CUADRO 9.2** Colonias atípicas de *Salmonella* spp. en medios sólidos selectivos.

Medio selectivo	Color antes de la inoculación	Características coloniales atípicas de <i>Salmonella</i> spp.
<b>Agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD)</b>	Claro, color rojo brillante	Rosa salmón o amarillas con o sin centro negro.
<b>Agar sulfito bismuto (SB)</b>	Opaco, verde pálido	Verdes con un halo oscuro muy pequeño. Si después de 48 h de incubación no se presentaron colonias típicas (consultar <b>Cuadro 9.1</b> ), evaluar las descritas aquí.
<b>Agar entérico Hektöen (HE)</b>	Oscuro, color verde	Rosa salmón o amarillas con o sin centro negro.

### Confirmación bioquímica preliminar

Para cada colonia pura desarrollada:

- Tomar del centro de la colonia con asa recta estéril e inocular por picadura y estría en agar triple azúcar hierro (TSI).
- Tomar del centro de la colonia con asa recta estéril e inocular por picadura y estría en agar lisina hierro (LIA).
- La reacción de descarboxilación de lisina es estrictamente anaerobia, deberán emplearse tubos inclinados donde el medio posea 4 cm de profundidad y 2.5 cm de pico de flauta.
- Los tapones de estos tubos deberán estar ligeramente flojos para permitir la liberación de H<sub>2</sub>S que en algunos casos se produce en exceso.
- Incubar a 36 ± 1 °C durante 24 ± 3 h.
- Interpretar resultados de acuerdo con el **Cuadro 9.3**.

**CUADRO 9.3** Cambios producidos en los medios Triple azúcar hierro (TSI).

Interpretación	Triple azúcar hierro (TSI) <sup>1</sup>			
	Superficie inclinada (pico de flauta)	Fondo de tubo	Precipitado negro	Gas
<b>Positivo</b>	Amarilla: lactosa o sacarosa	Amarillo: glucosa	Negro: producción de H <sub>2</sub> S	Grietas en el agar o burbujas: producción de CO <sub>2</sub> de glucosa
<b>Negativo</b>	Roja: lactosa y/o sacarosa negativa	Rojo o sin cambio: glucosa negativa	Ausencia color negro: sin producción de H <sub>2</sub> S	Agar íntegro o sin burbujas
<b><i>Salmonella</i> spp. típica<sup>2</sup></b>	Rojo: alcalinidad	Amarillo	Color negro (90% de cepas)	Grietas o burbujas
<b><i>Salmonella</i> spp. atípica<sup>2</sup></b>	Amarillo	Amarillo		
Interpretación	Agar lisina hierro (LIA)			
<b>Positiva</b>	Color púrpura: reacción alcalina	Color púrpura: reacción alcalina	Presencia: producción de H <sub>2</sub> S	
<b>Negativa</b>	Color amarillo: reacción ácida	Color amarillo: utilización glucosa	Ausencia: sin producción de H <sub>2</sub> S	
<b><i>Salmonella</i> spp. típica</b>	Púrpura	Púrpura	Presencia	
<b><i>Salmonella</i> spp. atípica<sup>3</sup></b>	Amarillo	Púrpura		

<sup>1</sup> Se recomienda fuera de NOM el empleo del agar Kligler hierro.

<sup>2</sup> Para los cultivos de TSI considerados presuntivos para *Salmonella* spp., continuar con la identificación bioquímica complementaria para determinar especie, incluyendo como cepa control a *Salmonella arizonae*.

<sup>3</sup> Todos los cultivos que hayan presentado esta reacción se considerarán como presuntivos y deberá continuarse con las pruebas bioquímicas complementarias y la serología, independiente de su resultado en TSI.

### Pruebas bioquímicas complementarias

Se deberán complementar las pruebas bioquímicas para los cultivos que hayan sido considerados como presuntivos de ser *Salmonella* spp. a partir de los resultados obtenidos en agar TSI y/o agar LIA, de acuerdo con las especificaciones indicadas en la sección anterior.

Incubar una serie de bioquímicas sin inocular como referencia para comparar los cambios ocasionados por los microorganismos después de la incubación. Así mismo, se realizarán controles de estas pruebas con las cepas mencionadas en la etapa de aislamiento.

#### a) Prueba de ureasa (convencional)

- Inocular los tubos de agar urea de Christensen, con un asa estéril, una estría cerrada masiva en la superficie del pico de flauta. El medio sin inocular puede tener color rojo-púrpura.
- Incubar  $36 \pm 1$  °C durante  $24 \pm 2$  h.
- *Salmonella* spp. no produce cambio en la coloración original (amarillo-anaranjado).

#### b) Caldo L-lisina descarboxilasa

Realizar esta prueba sólo si la prueba en agar LIA fue dudosa.

- Con asa estéril tomar una pequeña porción de cultivo. Cerrar el tapón del tubo con fuerza.
- Incubar a  $36 \pm 1$  °C por  $24 \pm 3$  h.
- *Salmonella* spp. genera una reacción alcalina por descarboxilación de la lisina (color púrpura del medio). Considerar la prueba como negativa por la presencia de un color amarillo del medio. Si el medio aparece descolorido (ni púrpura, ni amarillo), agregar unas gotas de colorante púrpura de bromocresol al 0.2% y leer nuevamente la reacción.

#### c) Detección de $\beta$ -galactosidasa

- Realizar una suspensión homogénea de la colonia seleccionada en un tubo conteniendo 0.25 mL de solución salina isotónica estéril.
- Adicionar una gota de tolueno y agitar.

- Incubar en baño de agua a  $36 \pm 1$  °C, dejar reposar por 5 min.
- Adicionar 0.25 mL del agente de detección de la  $\beta$ -galactosidasa y mezclar. Incubar nuevamente el tubo en el baño de agua a  $36 \pm 1$  °C durante  $24 \pm 3$  h.
- Examinar el tubo a diferentes intervalos de tiempo. Un color amarillo es indicativo de reacción positiva (se hace evidente en aproximadamente 20 min).
- Si se utilizan discos comerciales, seguir las instrucciones del fabricante.

#### **d) Prueba de Indol**

- Inocular un tubo conteniendo 5 mL del caldo triptona con una suspensión homogénea de la colonia sospechosa.
- Incubar a  $36 \pm 1$  °C por  $24 \pm 3$  h.
- Adicionar de 0.2 mL a 0.3 mL de reactivo de Kovac sin agitar y resbalando por las paredes.
- La formación de un anillo de color rojo indica una reacción positiva. Un anillo de color amarillo indica una reacción negativa.

#### **e) Prueba de Voges-Praskauer (VP)**

- Inocular una asada de la colonia seleccionada en un tubo estéril conteniendo 3 mL del medio VP.
- Incubar  $36 \pm 1$  °C por  $24 \pm 3$  h.
- Agitar el tubo.
- Adicionar dos gotas de solución de creatina, tres gotas de solución  $\alpha$ -naftol y, al final, dos gotas de solución de KOH 40%. Agitar después de cada reactivo.
- No tapar el tubo, interpretar la prueba como positiva si después de 10 minutos en presencia de aire aparece en la superficie una coloración roja.

#### **f) Alternativas en la identificación presuntiva del género *Salmonella* spp.**

Se pueden utilizar pruebas bioquímicas miniaturizadas como el API20E® o el sistema VITEK® descrito en la sección de métodos miniaturizados comerciales del presente manual. Asimismo, es posible emplear métodos de Biología molecular disponibles en el mercado para la identificación presuntiva de género *Salmonella* spp. Sin embargo, es necesario contar con validación y no deben ser usados como sustitutos de las pruebas fenotípicas (bioquímicas y/o serológicas). Estos sistemas se emplean de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

**CUADRO 9.4** Interpretación de pruebas bioquímicas para diferentes serotipos de *Salmonella* spp.

Pruebas <sup>a</sup>	Cepas de <i>Salmonella</i>									
	S. Typhi		S. Paratyphi A		S. Paratyphi B		S. Paratyphi C		Otras cepas	
	Reacción <sup>b</sup>	%	Reacción <sup>b</sup>	%	Reacción <sup>c</sup>	%	Reacción <sup>c</sup>	%	Reacción <sup>b</sup>	%
TSI producción de ácido de la glucosa	+	100	+	100	+		+		+	100
TSI formación de gas de la glucosa	<sup>-d</sup>	0	+	100	+		+		+	92
TSI producción de ácido de la lactosa	-	2	-	100	-		-		-	1
TSI producción de ácido de la sacarosa	-	0	-	0	-		-		-	1
TSI producción de H <sub>2</sub> S	+	97	-	10	+		+		+	92
Hidrólisis de urea	-	0	-	0	-		-		-	1
Descarboxilación de la lisina	-	98	-	0	+		+		+	95
Reacción de β-galactosidasa	-	0	-	0	-		-		-	2 <sup>e</sup>
Reacción de Voges-Proskauer	-	0	-	0	-		-		-	0
Producción de indol	-	0	-	0	-		-		-	1

<sup>a</sup> NOM-210. Apéndice normativo B.

<sup>b</sup> No todas las cepas muestran la reacción indicada. Puede ser más o menos. Depende de los serotipos causantes de la toxiinfección y el lugar de procedencia.

<sup>c</sup> Los porcentajes no se han encontrado en la literatura.

<sup>d</sup> *Salmonella* Typhi es anaerobio.

<sup>e</sup> *S. Arizonae* puede ser positiva o negativa a la lactosa pero siempre será β-galactosidasa positiva.

## Evaluación serológica

La aglutinación con el antisuero polivalente Poli A-I y Vi puede usarse como resultado confirmatorio de la presencia de *Salmonella* spp. para las cepas probadas por TSI y LIA. Existen cepas que no aglutinan con el polivalente, pero que dan reacciones típicas en TSI y LIA, para éstas es necesario confirmar usando la batería completa de pruebas bioquímicas.

### 1. Eliminación de cepas autoaglutinables

- En portaobjetos perfectamente limpio, depositar una gota de solución salina isotónica estéril (SSI), o bien, mezclar una gota de agua estéril con una gota de SSI y mezclar.
- Tomar con asa estéril la colonia presuntiva de *Salmonella* spp. y dispersarla en la gota de SSI, hasta obtener una suspensión homogénea y turbia.
- Inclinar y rotar en varias direcciones el portaobjetos suavemente por 30 a 60 s.
- Observar la suspensión sobre un fondo oscuro no brillante, de preferencia con una lupa.
- Si se observan agrupaciones de grumos de bacterias de diferentes tamaños, la cepa se considera como autoaglutinable.

Estas cepas deberán identificarse por pruebas bioquímicas complementarias y no someterse a la serotipificación.

### 2. Detección de los antígenos Poli A-I y Vi

Empleando una colonia presuntiva de *Salmonella* spp. no aglutinable y pura, realizar el siguiente procedimiento:

- En portaobjetos perfectamente limpio, depositar una gota de solución salina isotónica estéril (SSI), o bien, mezclar una gota de agua estéril con una gota de SSI y mezclar.
- Tomar con asa estéril la colonia presuntiva de *Salmonella* spp. y dispersarla en la gota de SSI, hasta obtener una suspensión homogénea y turbia.
- Adicionar una gota del antisuero O.
- Inclinar y rotar en varias direcciones el portaobjetos suavemente por 30 a 60 s.
- Observar la suspensión sobre un fondo oscuro no brillante, de preferencia con una lupa.

- Si se produce aglutinación, la reacción se considera positiva del antisuero O.
- Para fines de vigilancia sanitaria, enviar el cultivo al laboratorio nacional de referencia (Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura, CCAyAC) de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) para su identificación serológica o molecular.

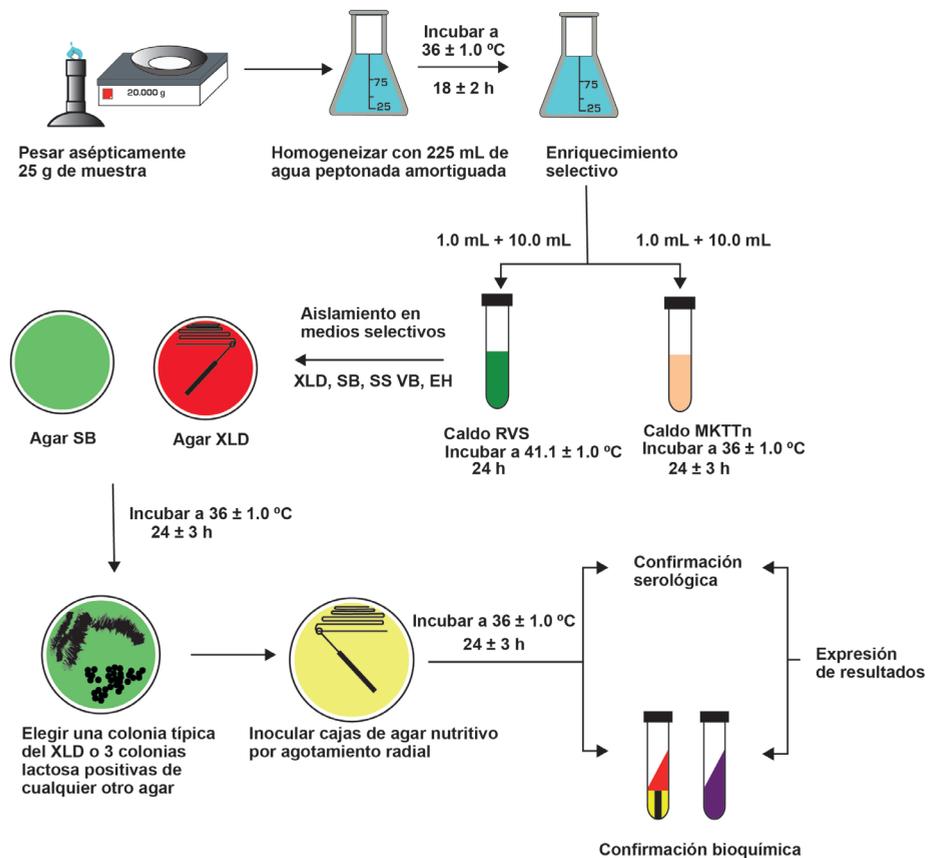


Figura 9.2 Determinación de *Salmonella* spp. en alimentos.

## Interpretación de resultados

- Reportar los cultivos determinados como presuntivos con las pruebas bioquímicas y confirmados por la serología como:  
*Salmonella* spp. en 25.0 g PRESENCIA.
- Reportar a partir de pruebas bioquímicas miniaturizadas comerciales los cultivos con resultados atípicos y clasificadas como no *Salmonella* spp. como:  
*Salmonella* spp. en 25.0 g AUSENCIA.
- Reportar placas de agar XLD, ASB y el tercer medio selectivo sin desarrollo y/o colonias atípicas como:  
*Salmonella* spp. en 25.0 g AUSENCIA.
- En caso de que la cantidad analizada sea menor a 25.0 g, se deberá reportar como:  
PRESENCIA o AUSENCIA en la cantidad (g o mL) de muestra analizada.
- En caso de que la muestra analizada sea una pieza entera, se deberá reportar como:  
PRESENCIA o AUSENCIA en las piezas analizadas.

## BIBLIOGRAFÍA

Montville T.J., Matthews K.R. & Kniel K.E. (2012). *Food Microbiology an Introduction*. 3<sup>rd</sup> ed. ASM Press. Estados Unidos de América, p. 205-221.

Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM 210-SSA1-2014. Productos y Servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Apéndice A Normativo, Método de referencia para el aislamiento de *Salmonella* spp. Diario Oficial de la Federación, 26 junio 2016. México. Recuperado el 26 junio de 2016 de [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015).



# 10

## Método para la determinación de *Vibrio cholerae* en alimentos, hielo y agua

---

### OBJETIVOS

- Realizar el análisis microbiológico para detectar *Vibrio cholerae* en alimentos, agua y/o hielo.
- Explicar el fundamento de cada etapa del análisis.

### GENERALIDADES

Entre los alimentos involucrados en ETA que están contaminados por *V. cholerae* resaltan los moluscos bivalvos, los crustáceos y los pescados frescos-refrigerados y congelados. Estos productos pueden generar enfermedades a los consumidores debido a que, desde su origen, están sometidos a contaminación microbiológica y química, entre otras, aunado a la forma de consumo que en muchos casos es cruda. El fin principal de la Norma Oficial Mexicana que regula estos productos desde el punto de vista sanitario es el de proteger la salud del consumidor.

El cólera es una enfermedad relacionada con el abastecimiento de aguas con poca higiene, o bien, de los alimentos provenientes de aguas contaminadas con materia fecal y que se consumen crudos. También puede aparecer *V. cholerae* O1 en moluscos bivalvos, crustáceos o pescados que se obtienen de aguas no contaminadas en donde el microorganismo forma parte de la microbiota autóctona.

La enfermedad del cólera fue descrita por primera ocasión por Pacini en 1854. Ésta se presenta por la ingesta de la bacteria viable, la cual se establece en el intestino delgado y libera una toxina termolábil. La producción de esta toxina provoca diarrea acuosa, síntomas característicos del cólera. Éstos pueden ir desde una diarrea acuosa ligera, hasta una diarrea severa con aspecto de “agua de arroz”. El establecimiento de la enfermedad por lo general es repentino, con periodos de incubación que varían entre las 6 horas y los 5 días. Esta enfermedad generalmente es autolimitante.

Las personas con cólera requieren de hidratación intravenosa u oral con soluciones que contengan cloruro de sodio, bicarbonato de sodio, cloruro de potasio y glucosa, ya que la muerte sobreviene debido a la deshidratación y pérdida de electrolitos esenciales.

Mediante estudios en personas voluntarias saludables, se ha demostrado que la dosis infectiva necesaria para provocar la enfermedad es aproximadamente de un millón de células, y se ha concluido que una vez adquirido el cólera, la pronta administración de suero oral o, en ciertos casos, la administración de fluidos vía intravenosa mejora rápidamente el curso de la enfermedad.

El género *Vibrio* incluye a los bacilos rectos o curvos Gram-negativo, oxidasa positivo (excepto la especie *metschnikovii*), anaerobios facultativos. Muchas especies de *Vibrio* spp. son patógenas para humanos y están implicadas en toxoinfecciones transmitidas por alimentos. La mayoría de los microorganismos que pertenecen a este género no crecen en medios sin cloruro de sodio a excepción de *V. cholerae* y *V. mimicus*; debido a esta característica no es considerado un vibrio halófilo, aunque requieran trazas del ión sodio para su crecimiento.

La especie *cholerae* comprende varios grupos antigénicos somáticos incluyendo el grupo O1, el cual se asocia con los biotipos clásico y El Tor. A su vez, este grupo O1 puede tener varios serotipos incluyendo Inaba, Ogawa e Hikojima. Las especies de *V. cholerae* no-O1 (referidos en la literatura como vibrios no aglutinables o NAG, por sus siglas en inglés) se encuentran en aguas estuarinas y pueden causar enfermedad gastrointestinal, aunque típicamente es menos severa que la causada por *V. cholerae* O1. El serotipo O139, identificado por primera vez en 1992 como el causante de una epidemia de cólera en la India y Bangladesh (el cual no se ha podido encontrar en aguas estuarinas), es una excepción de los vibrios NAG que sí produce los síntomas clásicos del cólera.

Otros microorganismos pertenecientes al género *Vibrio* que son causantes de enfermedades gastrointestinales transmitidas por alimentos son *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*.

*V. parahaemolyticus* es una bacteria halófila encontrada como microbiota normal de aguas y animales que habitan en los estuarios. El microorganismo está mundialmente distribuido en ambientes estuarios y costeros, y se ha aislado de muchas especies de pescados, mariscos y crustáceos.

*V. vulnificus* es una bacteria halófila encontrada en ambientes estuarinos y es fenotípicamente similar a *V. parahaemolyticus*. Esta bacteria causa enfermedades transmitidas por alimentos y en heridas, cualquiera de éstas puede progresar rápidamente hasta una septicemia mortal. Los moluscos bivalvos crudos son la principal fuente de transmisión alimentaria del *V. vulnificus*.

Otros *Vibrio* spp. halófilicos, como *V. fluvialis*, *V. hollisae*, *V. alginolyticus*, *V. furnissii* y *V. metschnikovii*, se han asociado con gastroenteritis y están presentes en ambientes estuarinos junto con otras especies patógenas y no patógenas de *Vibrio*.

## **FUNDAMENTO**

El método de detección estándar para la recuperación y la detección de *Vibrio cholerae* es cualitativo. Sin embargo, se recomienda para las especies aisladas de *V. cholerae* de los serotipos O1 y no-O1 demostrar la producción de la toxina del cólera. Este método describe un esquema general que consiste en:

- Enriquecimiento a diferentes temperaturas, dependiendo del tipo de alimento que se desee analizar, donde se pretende incrementar las poblaciones de *Vibrio* e inhibir otros microorganismos presentes en la muestra.
- Aislamiento diferencial en medio sólido selectivo, el cual restringe el crecimiento de otros géneros diferentes a *Vibrio*, permitiendo el reconocimiento de colonias sospechosas de la especie *Vibrio cholerae*.
- Purificación: las colonias características, sospechosas de pertenecer a la especie *cholerae*, se purifican en medios no selectivos.
- Identificación bioquímica que permite la identificación de las cepas de *V. cholerae*.
- Pruebas serológicas, para tipificar los cultivos de *V. cholerae*.

## **MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES**

### **Material necesario para preenriquecimiento de *V. cholerae* en agua y hielo:**

- 1 tubo de ensayo con 10.0 mL de agua peptonada alcalina (1.0% P/V) pH =  $8.5 \pm 0.2$  (APA).<sup>a</sup>

**Material necesario para preenriquecimiento de *V. cholerae* en moluscos bivalvos en concha o desconchados, frescos, refrigerados o congelados:**

- 1 matraz Erlenmeyer con 450.0 mL de agua peptonada (1.0% P/V) alcalina (pH = 8.5 ± 0.2) (APA).<sup>a</sup>
- 1 matraz Erlenmeyer vacío y estéril.<sup>a</sup>
- 4 tubos con 9.0 mL de agua peptonada (1.0% P/V) alcalina (pH = 8.5 ± 0.2) (APA).<sup>a</sup>

**Material necesario para preenriquecimiento de *V. cholerae* para demás productos de la pesca refrigerados o congelados (parte comestible), pasteurizados, ahumados, semipreparados (crudos o precocidos, empanizados, rebozados o capeados, empanizados y congelados).**

- 2 matraces Erlenmeyer con 225.0 mL de agua peptonada (1.0% P/V) alcalina (pH = 8.5 ± 0.2) (APA).<sup>a</sup>
- 4 tubos con 9.0 mL de agua peptonada (1.0% P/V) alcalina (pH = 8.5 ± 0.2) (APA).<sup>a</sup>

**Material necesario para preenriquecimiento de *V. cholerae* en quesos frescos:**

- 1 matraz Erlenmeyer con 225.0 mL de agua peptonada (1.0% P/V) alcalina (pH = 8.5 ± 0.2) (APA).<sup>a</sup>
- 5 tubos con 9.0 mL de agua peptonada (1.0% P/V) alcalina (pH = 8.5 ± 0.2) (APA).<sup>a</sup>

**Material necesario para preenriquecimiento de *V. cholerae* en quesos de suero:**

- 2 matraces Erlenmeyer con 225.0 mL de agua peptonada (1.0% P/V) alcalina (pH = 8.5 ± 0.2) (APA).<sup>a</sup>
- 10 tubos con 9.0 mL de agua peptonada (1.0% P/V) alcalina (pH = 8.5 ± 0.2) (APA).<sup>a</sup>

**Material necesario para preenriquecimiento de *V. cholerae* en helados y bases o mezclas para helados:**

- 1 matraz Erlenmeyer con 225.0 mL de agua peptonada (1.0% P/V) alcalina (pH = 8.5 ± 0.2) (APA).<sup>a</sup>
- 5 tubos con 9.0 mL de agua peptonada (1.0% P/V) alcalina (pH = 8.5 ± 0.2) (APA).<sup>a</sup>

**NOTA**

El siguiente material será el mismo para el análisis de cualquier tipo de muestra:

- 3 cajas de Petri con 20.0 mL de agar tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa (TCBS).<sup>b</sup>
- Opcional: además del TCBS, 3 cajas de Petri con 20.0 mL de agar modificado con celobiosa, polimixina B y colistina (mCPC).<sup>b</sup>
- 3 cajas de Petri con 20.0 mL de agar T<sub>1</sub>N<sub>1</sub> (agar triptona con 1% NaCl) y/o 3 cajas de Petri con 20.0 mL de agar soya tripticaseína con 2.0% de NaCl (P/V).<sup>c</sup>
- 3 tubos con 3.0 mL de agar triple-azúcar-hierro (TSI) más 2% NaCl y/o agar de hierro Kligler más 2% NaCl inclinados (KIA).<sup>d</sup>
- 3 tubos con 3.0 mL de agar de hierro Kligler más 2% NaCl inclinados (KIA).<sup>d</sup>
- 4 tubos con 3.0 mL de agar arginina glucosa más 2% NaCl inclinados (AAG). Uno de los 3 tubos se utiliza como control de medio, sin inocular.<sup>d</sup>
- 1 caja (dividir en 3 segmentos) o 3 tubos con 3.5 mL de agar o caldo triptona sin NaCl (T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>).<sup>d</sup>
- 1 caja (dividir en 3 segmentos) o 3 tubos con 3.5 mL de agar o caldo triptona más 3.0% de NaCl (T<sub>1</sub>N<sub>3</sub>).<sup>d</sup>
- 1 caja (dividir en 3 segmentos) o 3 tubos con 3.5 mL de caldo o agar triptona más 6.0% de NaCl (T<sub>1</sub>N<sub>6</sub>).<sup>d</sup>
- 6 tubos con 5.0 mL de medio Hugh y Leifson más 2% NaCl más 1.0% de glucosa (P/V).<sup>d</sup>
- 3 discos para prueba de oxidasa.<sup>d</sup>
- 3 discos para prueba de ONPG.<sup>d</sup>
- 3 tubos con 3.5 mL de agar hierro lisina (LIA) más 2% NaCl inclinados.<sup>d</sup>
- 3 tubos con 3.5 mL de caldo RM/VP más 2% NaCl.<sup>d</sup>
- 3 tubos con 3.5 mL de caldo rojo de fenol más 2% NaCl más 1.0% de arabinosa (P/V).<sup>d</sup>

**SOLUCIONES, REACTIVOS E INDICADORES**

- 1 frasco gotero con reactivo de Kovac.<sup>d</sup>
- 1 frasco gotero con reactivo o discos para la prueba de la oxidasa (tetrametil-p-fenilendiamina, TMPD).<sup>d</sup>

- Colorantes necesarios para la tinción de Gram.<sup>c, d</sup>
- Aceite mineral o vaspar.<sup>c</sup>
- Aceite de inmersión.<sup>c, d, e</sup>
- Solución de desoxicolato de sodio al 0.5% en agua destilada estéril para la prueba del hilo mucoide.<sup>d</sup>

### **MATERIAL Y EQUIPO**

- 1 bolsa para Stomacher® o vaso de licuadora estéril.<sup>a</sup>
- Stomacher® o motor para licuadora.<sup>a</sup>
- Mechero Bunsen.<sup>a</sup>
- 1 pipeta estéril con algodón de 1.0, 5.0 y 10.0 mL.<sup>a</sup>
- Pipetas Pasteur estériles.<sup>a, b, c, d, e</sup>
- Propipeta.<sup>a, b, c, d, e</sup>
- 1 caja de Petri estéril.<sup>a</sup>
- Baño de agua a  $35 \pm 2$  °C y  $42 \pm 1$  °C.<sup>a, b, c, d</sup>
- Incubadora a  $35 \pm 2$  °C.<sup>a, b, c, d</sup>
- Incubadora a  $42 \pm 2$  °C.<sup>a, b, c, d</sup>
- Balanza granataria.<sup>a</sup>
- Cucharas estériles u otros instrumentos apropiados para transferir muestras de alimentos.<sup>a</sup>
- Asas bacteriológicas de 3 mm de diámetro.<sup>b, c, d</sup>
- Asa bacteriológica de platino para efectuar la prueba de oxidasa.<sup>d</sup>
- Tijeras y pinzas estériles.<sup>a</sup>
- Cubreobjetos y portaobjetos.<sup>c, d, e</sup>
- Microscopio.<sup>c, d, e</sup>
- Equipo de filtración por membrana (sólo para análisis de agua o hielo).<sup>a</sup>
- Filtros de membrana de 0.45 µm de poro y 47 mm de diámetro.
- Pinzas para membranas.

**NOTAS**

- <sup>a</sup> Material necesario al inicio de la práctica.
- <sup>b</sup> Material necesario a las 24 h de iniciada la práctica.
- <sup>c</sup> Material necesario a las 48 h de iniciada la práctica.
- <sup>d</sup> Material necesario a las 72 h de iniciada la práctica.
- <sup>e</sup> Material necesario a las 96 h de iniciada la práctica.

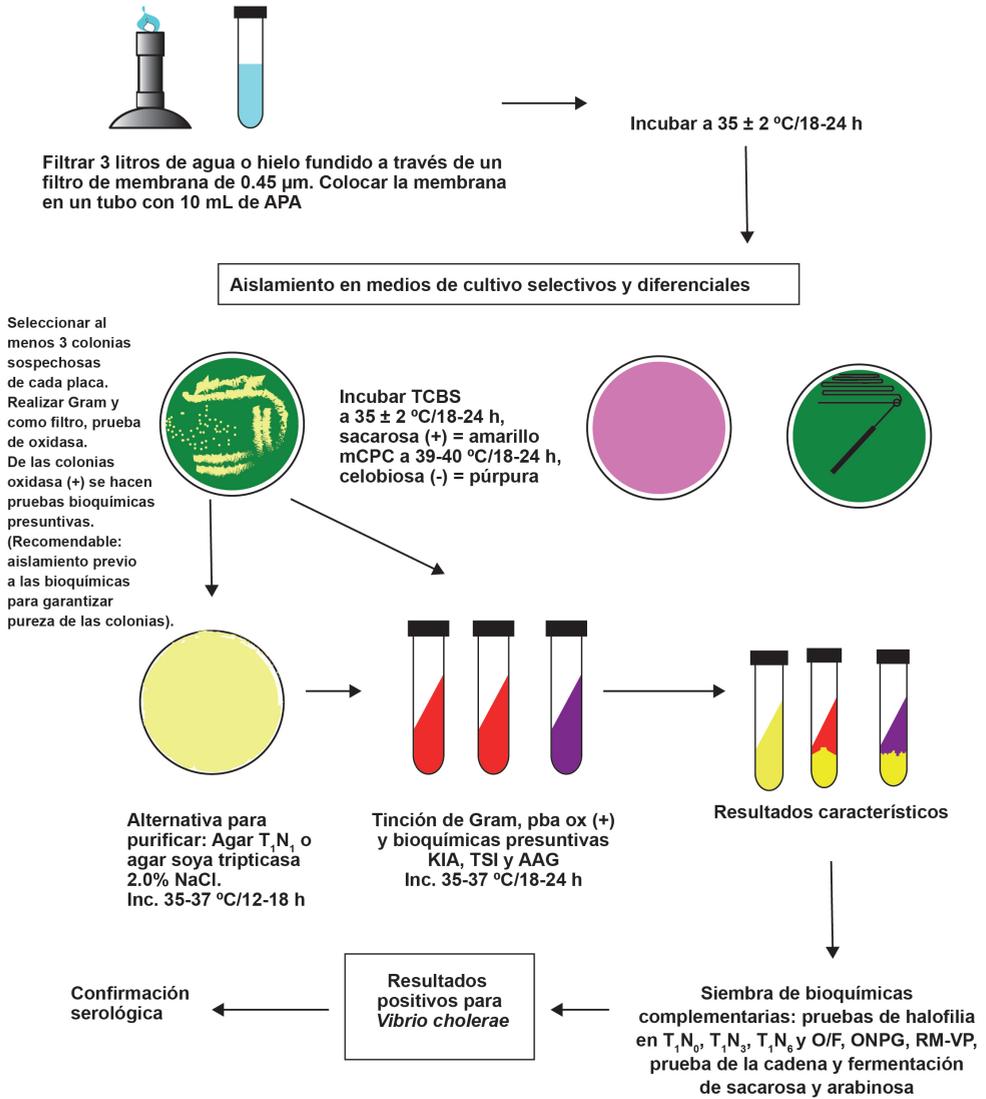


Figura 10.1 Determinación de *V. cholerae* en agua y hielo.

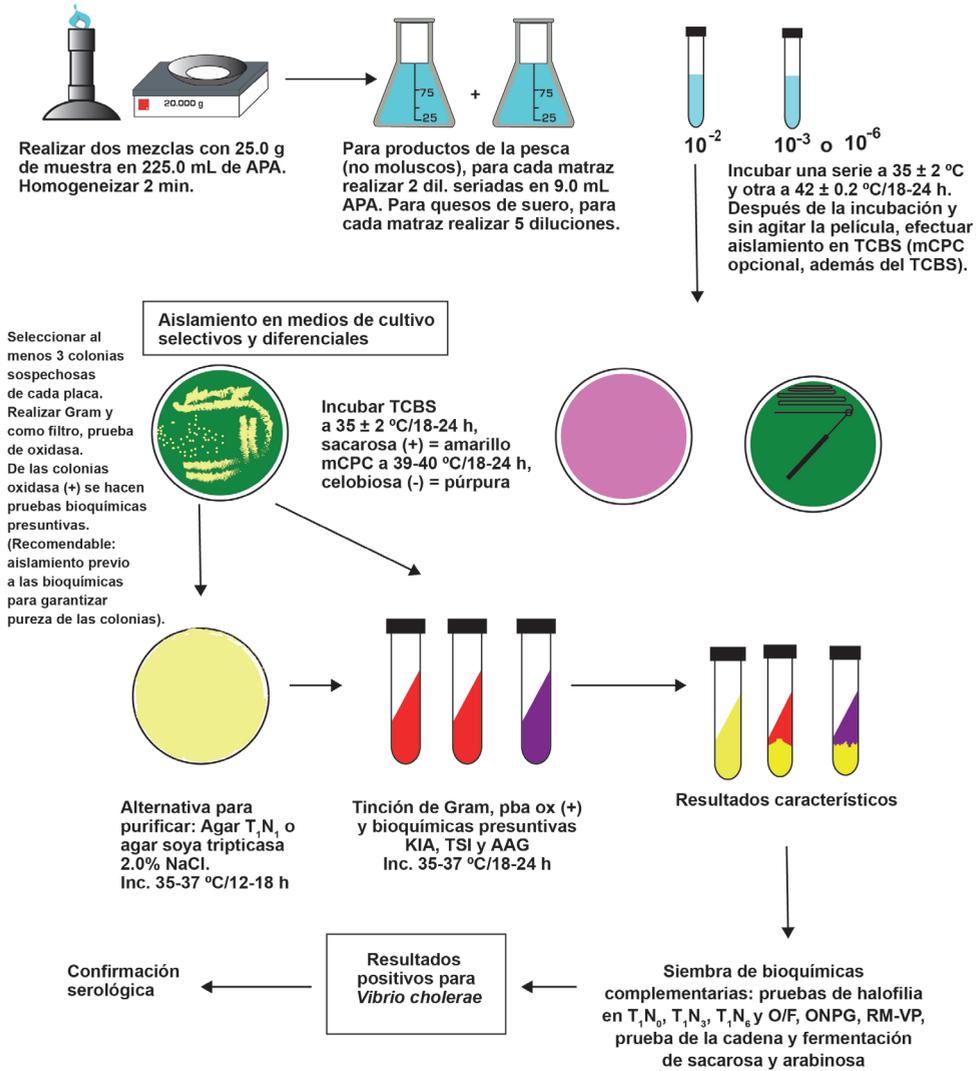


Figura 10.2 Determinación de *V. cholerae* en demás productos de pesca que no sean moluscos bivalvos y en quesos de suero.

MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS PARA EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS

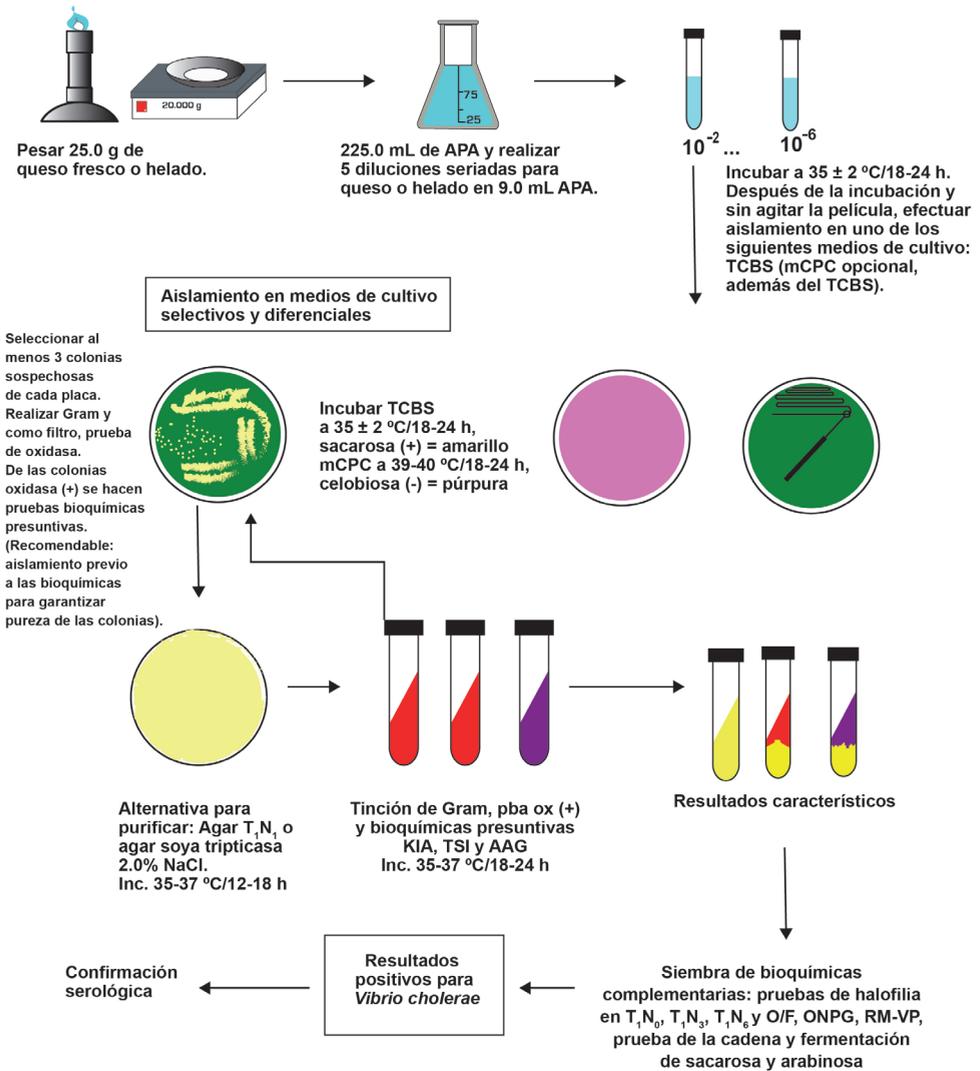
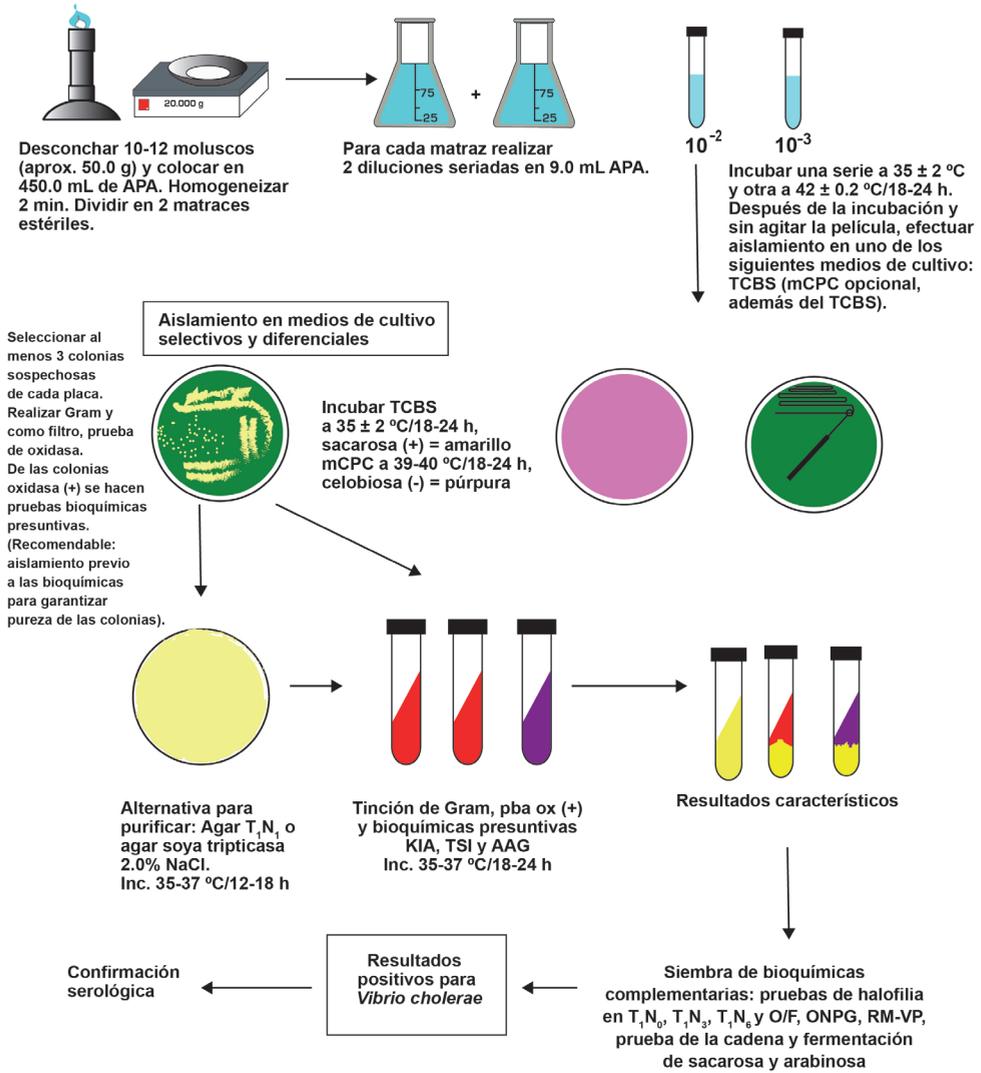


Figura 10.3 Determinación de *V. cholerae* en quesos frescos y helados.



**Figura 10.4** Determinación de *V. cholerae* en moluscos bivalvos en concha o desconchados, frescos, refrigerados o congelados.

**PROCEDIMIENTO****1. Enriquecimiento**

El enriquecimiento para la detección de este microorganismo en los alimentos se realiza de acuerdo con el tipo de alimento o bebida que se trate. En el **Cuadro 10.1** se presenta el procedimiento específico de las diversas muestras contempladas para el análisis de *V. cholerae*.

**CUADRO 10.1** Enriquecimiento para la detección de *V. cholerae* en agua y hielo o diversos alimentos destinados al consumo humano.

Tipo de muestra	Preparación de la muestra	Incubación del enriquecimiento	
		35 ± 2 °C/ 18-24 h	42 ± 0.2 °C/ 18-24 h
Agua y hielo	Filtrar 3 litros de agua o hielo fundido a través de un filtro de membrana de 0.45 µm. Colocar la membrana en un tubo con 10 mL de APA.	X	---
Moluscos bivalvos, en concha, desconchados, frescos, refrigerados o congelados	Desconchar 10-12 moluscos (carne y líquido). 50.0 g de la muestra en 450.0 mL APA. Homogeneizar 2 min. Dividir en 2 matraces estériles. Realizar 2 diluciones más en 9.0 mL de APA.	X (3 diluciones)	X (3 diluciones)
Demás productos de la pesca (incluyendo pescados ahumados)	Tomar carne del área de las vísceras, incluyendo éstas. 25.0 g de la muestra en 225.0 mL de APA por duplicado. Homogeneizar 2 min. Realizar 2 diluciones más en 9.0 mL de APA.	X (3 diluciones)	X (3 diluciones)
Quesos de suero	Pesar 25.0 g de la muestra en 225.0 mL de APA por duplicado. Homogeneizar 2 min. Realizar 5 diluciones más en 9.0 mL de APA.	X (6 diluciones)	X (6 diluciones)
Quesos frescos, helados, sorbetes y bases para helados	Pesar 25.0 g de la muestra en 225.0 mL de APA. Homogeneizar 2 min. Realizar 5 diluciones más en 9.0 mL de APA.	X (6 diluciones)	---

- Para todos los casos proseguir con el inciso 2.

## 2. Resiembra

Después de la incubación y **sin agitar** los matraces, tomar de la película e inocular una placa de agar TCBS y optativo mCPC, además del TCBS:

1. Agar con tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS). Incubar a  $35 \pm 2$  °C durante 18 a 24 h.
2. Agar modificado con celobiosa, polimixina B y colistina (mCPC). La polimixina inhibe al biotipo Clásico de *V. cholerae*. Incubar durante 39-40 °C durante 18 a 24 h.

## 3. Morfología colonial

Examinar las placas a fin de determinar si se presentan las características coloniales que a continuación se describen:

- Agar TCBS. Las colonias de *V. cholerae* (El Tor y Clásico) son grandes, lisas, amarillas (positivas para la fermentación de la sacarosa) y ligeramente achatadas, con el centro opaco y los bordes translúcidos. Las especies de *Vibrio* no producen colonias pequeñas de color crema en agar TCBS; en cambio, las colonias de *V. mimicus*, que están estrechamente relacionadas con *V. cholerae*, son verdes (sacarosa negativas). La mayoría de las demás especies de *Vibrio* crecen en agar TCBS y producen colonias amarillas y verdes.
- Agar mCPC. Las colonias de *V. cholerae* El Tor son púrpuras (negativas para la fermentación de la celobiosa). El *V. vulnificus* produce colonias amarillas achatadas, con el centro opaco y los bordes translúcidos.
- La mayoría de las demás especies de *Vibrio* no crecen fácilmente en agar mCPC.

## 4. Selección y aislamiento

Seleccionar por lo menos tres colonias sospechosas de cada placa y realizar a cada una tinción de Gram y prueba de oxidasa. A las colonias que muestren un cultivo puro de bacilos Gram negativos, que pueden o no ser curvos y son oxidasa (+), realizar las pruebas bioquímicas presuntivas inoculando cada colonia sospechosa en KIA, TSI y AAG. Como alternativa, sólo si se cuenta con suficiente tiempo, previo a las pruebas bioquímicas presuntivas, **aislarlas** en:

1. **Paso alternativo para purificación de colonias sospechosas a partir de TCBS y/o mCPC.** Agar T<sub>1</sub>N<sub>1</sub> o agar soya tripticasa con 2.0% de NaCl e incubar a 35-37 °C durante 12-18 h. Es necesario hacer un cultivo en un medio no selectivo, a fin de garantizar la pureza de las colonias antes de las pruebas bioquímicas.
2. Otro **segundo paso alternativo para purificación**, que se realiza posterior al paso descrito en el punto número 1, consiste en usar agar gelatina (GA) y agar gelatina con 3% de NaCl (GS) para determinar la tolerancia de los cultivos puros a la sal. Dividir las placas en tantos sectores como colonias sospechosas se desee identificar, inocular una línea recta en el centro de un sector de las placas, tanto de GA como de GS con cada cultivo puro. Incubar a 35-37 °C durante 18 a 24 horas. *V. cholerae* y *V. mimicus* crecerán. *Vibrio* spp. halófilico crecerá en ambas placas, porque no requieren de sal. Sólo en la placa con GS. Para leer la reacción de la gelatinasa, sostener la placa sobre una superficie negra, observará un halo opaco alrededor de la colonia de los microorganismos gelatinasa positivos.
3. Ya sea que se haya realizado uno o los dos pasos de purificación, o bien, si se optó por tomar colonias aisladas y sospechosas directamente a partir de las placas con TCBS y/o mCPC, y una vez comprobada la pureza con tinción de Gram, se sugiere, como filtro, realizar prueba de oxidasa y prueba del hilo mucoide. Si el cultivo puro resulta ser oxidasa positiva (presencia del citocromo oxidasa) y positivo en la prueba del hilo mucoide (todas las cepas de *V. chole* son positivas), realizar las pruebas bioquímicas presuntivas y complementarias descritas a continuación.

#### 4.1. Prueba de oxidasa

- Colocar un círculo de papel filtro en una caja de Petri y humedecerlo con algunas gotas de reactivo de oxidasa. Alternativamente se puede utilizar un disco reactivo comercial.
- Tomar suavemente una porción del cultivo desarrollado en agar soya tripticasa con NaCl al 2.0% o agar T<sub>1</sub>N<sub>1</sub> y depositarlo en el papel filtro anterior.

Para los microorganismos oxidasa positivos, el papel se tornará púrpura oscuro o azul en pocos segundos. Las especies patógenas de *Vibrio* son oxidasa positivas (excepto el *V. metschnikovii*).

## 4.2. Prueba del hilo mucoide o “cuerda”

La prueba del hilo mucoide, también llamada de *cadena* o *cuerda*, es muy útil como prueba presuntiva para cuando se sospecha de *V. cholerae*, debido a que todos los biotipos dan positivo y, por añadidura, sirve para excluir las especies que no son *Vibrio*, particularmente las cepas de *Aeromonas*, que por lo general son negativas. Otras especies de *Vibrio* pueden dar una reacción positiva o débil a la prueba de la cuerda.

A partir de un cultivo fresco proveniente de un agar no selectivo (como el agar T<sub>1</sub>N<sub>1</sub>), sobre un portaobjetos emulsionar una porción del cultivo en una pequeña gota de desoxicolato de sodio al 0.5% en agua destilada estéril. Al cabo de 60 segundos las células se lisan (pérdida de la turbidez) y el DNA forma una especie de rosario cuando se levanta con un palillo o con un asa, de material plástico, (hasta 2 o 3 cm) del portaobjetos.

## 5. Diferenciación. Pruebas bioquímicas presuntivas y complementarias

La fórmula para todos los medios de pruebas bioquímicas deberán contener por lo menos un 2.0% de NaCl.

Se recomiendan los siguientes medios porque las reacciones permiten efectuar una diferenciación presuntiva entre la mayoría de las especies de *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* y otras bacterias. La diferenciación de las colonias sospechosas se realiza por duplicado en:

### 5.1. Agar triple azúcar hierro (TSI) y agar Kligler hierro (KIA)

- Registrar las características del medio TSI y KIA antes de la inoculación (color del medio).
- Tomar suavemente una porción del centro de la colonia con asa bacteriológica recta y estéril e inocular por picadura y estría en un tubo con agar triple azúcar hierro (TSI) y en agar de Kligler (KIA) inclinado.
- Incubar el medio TSI y KIA a  $35 \pm 2$  °C durante 18 a 24 h.
- Las reacciones de *V. cholerae* en KIA que contenga glucosa y lactosa son similares a aquellas de las *Enterobacteriaceae* no fermentadoras de la lactosa (pico de flauta alcalina [roja], fondo ácido [amarillo], no produce gas, ni H<sub>2</sub>S). Sin embargo, en TSI las cepas de *V. cholerae* producen un pico de flauta ácido (amarillo), un fondo ácido (amarillo) y no producen gas, ni H<sub>2</sub>S.

## 5.2. Agar arginina y glucosa (AAG)

- Registrar las características del medio AAG antes de la inoculación (color del medio). Se sugiere utilizar un tubo de medio AAG sin inocular como control del color inicial.
- Tomar suavemente una porción del centro de la colonia con asa bacteriológica recta y estéril e inocular por picadura y estría en un tubo con medio AAG inclinado.
- Incubar el medio AAG con el tapón flojo a  $35 \pm 2$  °C durante 18 a 24 h.
- La determinación de la capacidad enzimática de un microorganismo de descarboxilar la L-arginina para formar la diamina putrescina se hace evidente con la resultante alcalinidad. La descarboxilación de la L-arginina se evidencia con un pico de flauta color púrpura (alcalino).
- La dihidrolasa positiva producirá dos moléculas de amoníaco más dióxido de carbono + ATP a través del intermediario L-ornitina, haciéndose evidente con la resultante alcalinidad con un pico de flauta color púrpura.
- En la dihidrolasa negativa no se producirá cambio alguno en el color original del medio AAG antes de la inoculación; es posible poder apreciar un ligero cambio del color inicial del medio de cultivo hacia el amarillo en el fondo del tubo, provocado por una ligera acidificación producida a partir de la fermentación de la glucosa.
- *V. cholerae* y *V. mimicus* presentarán una pendiente sin cambio del color original del medio AAG y posiblemente el fondo del tubo ácido (amarillo), debido a que no hidrolizan la arginina. No se produce H<sub>2</sub>S ni gas.

## 5.3. Agar lisina hierro

- Registrar las características del medio LIA antes de la inoculación (color del medio).
- Tomar suavemente una porción del centro de la colonia con asa bacteriológica recta y estéril, estriar el pico de flauta y punzar el fondo del medio dos veces en un tubo con medio (LIA) inclinado.
- Incubar con las tapas flojas; 18-24 h de incubación a  $35 \pm 2$  °C.
- La determinación de la capacidad enzimática de un microorganismo de descarboxilar la lisina para formar una amina se hace evidente con la resultante alcalinidad. La descarboxilación de la lisina se evidencia con un pico de flauta/extremo inferior color púrpura (alcalino).

- La descarboxilación negativa se hace evidente por el pico de flauta púrpura/ extremo inferior amarillo (ácido); fermentación sólo de la glucosa.
- La desaminación de la lisina se hace evidente por un pico de flauta rojo/ extremo inferior color amarillo.

#### 5.4. Prueba de halofilia

- Tomar suavemente una porción del cultivo desarrollado en KIA o TSI o AAG con asa bacteriológica estéril y suspender el inóculo en un tubo con los siguientes medios:
  - Caldo triptona con NaCl al 0.0% (T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>)
  - Caldo triptona con NaCl al 3.0% (T<sub>1</sub>N<sub>3</sub>)
  - Caldo triptona con NaCl al 6.0% (T<sub>1</sub>N<sub>6</sub>)
- Incubar los medios a 35 ± 2 °C durante 18 a 24 h.  
*V. cholerae* y *V. mimicus* crecerán en T<sub>1</sub>N<sub>0</sub> y T<sub>1</sub>N<sub>3</sub>, pero no en T<sub>1</sub>N<sub>6</sub>.

Algunos géneros de bacterias que no son *Vibrio* y que presentan reacciones similares a las de *V. cholerae* en medios de TSI y LIA no crecen en T<sub>1</sub>N<sub>3</sub>. La mayoría de las especies de *Vibrio* spp. que incluyen algunos *V. cholerae* no O1, crecen únicamente en T<sub>1</sub>N<sub>3</sub> y no crecen en T<sub>1</sub>N<sub>6</sub> ni en concentraciones mayores de sal.

#### 5.5. Prueba de halofilia alternativa

Alternativamente se realiza la prueba de halofilia en cajas de Petri con los siguientes medios de cultivo:

- Agar gelatina (GA)
- Agar gelatina con NaCl al 3.0% (GS 3.0%)
- Agar gelatina con NaCl al 6.0% (GS 6.0%)
- Dividir cada placa en tantos sectores como cultivos se deseen probar. Tomar suavemente una porción del cultivo desarrollado en KIA, TSI o AAG con asa bacteriológica estéril e inocular en el centro de cada sector una estría recta. Incubar a 35-37 °C durante 18 a 24 h.  
*V. cholerae* y *V. mimicus* crecen en 0.0% y en 3.0% de sal y rara vez en 6.0% de cloruro de sodio. Para leer la reacción de la gelatinasa, sostener la placa

sobre una superficie negra, observar un halo opaco alrededor de la colonia de los microorganismos gelatinasa positivos. Son gelatinasa positivas las especies *cholerae*, *mimicus*, *parahaemolyticus* y *vulnificus*.

### 5.6. Prueba de oxidación-fermentación

- Tomar suavemente una porción del cultivo desarrollado en KIA, TSI o AAG con asa bacteriológica estéril e inocular por picadura en dos tubos con el medio Hugh-Leifson.
- Añadir una capa de aceite mineral estéril a uno de los tubos para incubación en anaerobiosis.
- Incubar ambos tubos a 35-37 °C durante 18 a 24 h.

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

### 5.7. Caldo RM-VP (rojo de metilo-Voges Proskauer)

- Con asa bacteriológica recta estéril tomar crecimiento del tubo TSI, KIA o LIA e inocular el tubo con caldo RM-VP.

#### 5.7.1. Prueba de Voges-Proskauer (VP)

- Para la prueba de Voges-Proskauer **incubar a  $35 \pm 2$  °C durante 18-24 h.**
- Transferir a un tubo estéril un mililitro de cultivo.
- Adicionar a este cultivo, 0.6 mL de reactivo de VP1 (alfa-naftol etanólico al 5%), agitar y agregar 0.2 mL del reactivo VP2 (hidróxido de potasio al 40%).
- Adicionar algunos cristales de creatinina (opcional).
- Agitar nuevamente y dejar reposar el tubo en forma inclinada, con el objeto de que la reacción se lleve a cabo en presencia de oxígeno.
- Interpretar los resultados después de 2 h de incubación a temperatura ambiente. La prueba que indica la presencia del producto final neutro, acetilmetilcarbinol (acetoina), 2-3 butanodiol o el diacetil estará indicada por un color después de revelar con reactivos VP1 y VP2: anillo rojizo.

### 5.7.2. Prueba de rojo de metilo

- Para la prueba de rojo de metilo (RM) **incubar a  $35 \pm 2$  °C** el resto del medio RM/VP durante 48 h más (**96 h de incubación en total** a partir de la inoculación inicial del medio RM/VP).
- Adicionar al medio de cultivo dos a tres gotas de solución indicadora de rojo de metilo.
- Agitar e interpretar los resultados en forma inmediata. La prueba que indica la capacidad de un microorganismo para producir y mantener estables los productos finales ácidos, a partir de la fermentación de la glucosa y vencer la capacidad *buffer* del sistema, estará indicada por un color distintivo rojo brillante estable en la superficie del medio.

### 5.8. Caldo arabinosa y caldo sacarosa

- Con asa bacteriológica recta estéril, tomar crecimiento del tubo TSI, KIA o LIA e inocular en el tubo que contiene caldo rojo de fenol más 1% de arabinosa y el caldo rojo de fenol más 1% de sacarosa.
- Incubar a  $35 \pm 2$  °C durante  $24 \pm 2$  h.
- Interpretar resultados. La determinación de la capacidad de un microorganismo para fermentar un hidrato de carbono específico incorporado al medio basal, caldo rojo de fenol y producir ácido estará indicado por un color amarillo.

### 5.9. Prueba rápida del ONPG en discos

- Preparar una suspensión bastante densa proveniente del TSI o KIA con 0.2 mL de solución salina isotónica estéril en un tubo de 13 x 100 mm. Mezclar perfectamente.
- Colocar un disco sobre la suspensión bacteriana e incubar en baño de agua a 35-37 °C. Examinar a intervalos de 15 min durante 1 h: la mayoría de las reacciones positivas (color amarillo) aparecerá en 15-30 min. Dejar los tubos con respuesta negativa hasta 24 h antes de descartar. En algunos casos se pueden observar reacciones tardías. Un color amarillo denota una reacción positiva y, por lo tanto, la presencia de la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

## 6. Identificación y confirmación de *V. cholerae* O1, *V. cholerae* no O1 y *V. mimicus* a través de pruebas bioquímicas complementarias

Leer los resultados de las prueba bioquímicas de TSI, KIA, AAG, T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>, T<sub>1</sub>N<sub>3</sub>, T<sub>1</sub>N<sub>6</sub> además del caldo glucosa de Hugh-Leifson. También se sugiere realizar una tinción de Gram a un cultivo de 18 a 24 h de incubación.

La interpretación de las pruebas bioquímicas para identificación de *V. cholerae* y otras especies bacterianas afines figuran en los **cuadros 10.2, 10.3 y 10.4**.

**CUADRO 10.2** Reacciones de algunas especies de *Vibrio* spp. y microorganismos relacionados en medios sólidos diferenciales.

Microorganismo	Agar hierro-Kligler (KIA)		Agar hierro-tres azúcares (TSI)		Agar arginina glucosa (AAG)	
	Pico de flauta	Fondo de tubo	Pico de flauta	Fondo de tubo	Pico de flauta	Fondo de tubo
<i>V. cholerae</i>	Lac -	Gluc +	Sac + (- raro)	Gluc +	ADH -	Gluc lig. +
<i>V. mimicus</i>	Lac -	Gluc +	Sac - (+ raro)	Gluc +	ADH -	Gluc +
<i>V. parahaemolyticus</i>	Lac -	Gluc +	Sac -	Gluc +	ADH -	Gluc +
<i>V. alginolyticus</i>	Lac -	Gluc +	Sac +	Gluc +	ADH -	Gluc +
<i>V. vulnificus</i>	Lac - o +	Gluc +	Sac - (+ raro)	Gluc +	ADH -	Gluc +
<i>A. hydrophila</i>	Lac - o +	Gluc +	Sac - o +	Gluc +	ADH-	Gluc -
<i>P. shigelloides</i>	Lac - o +	Gluc +	Sac - o +	Gluc +	Neutro	Neutro

Ninguna de las especies de *Vibrio* spp. aquí enlistadas producen ácido sulfhídrico en KIA, TSI, LIA o AAG, o gas de la glucosa en cantidades detectables en KIA, TSI o AAG. Algunas especies de *Aeromonas* spp. pueden producir gas a partir de la glucosa en estos medios.

**CUADRO 10.3** Características mínimas para la identificación de *Vibrio cholerae*.

<b>Característica</b>	<b><i>Vibrio cholerae</i></b>
Morfología	Bacilo Gram-negativo (pueden ser curvos)
Citocromo oxidasa	+
TSI	Sacarosa + (- raro) Glucosa + gas - H <sub>2</sub> S -
KIA	Lactosa - Glucosa + gas - H <sub>2</sub> S -
Dihidrolasa arginina en AAG	- Glucosa (ligeramente +)
Lisina descarboxilasa	+
Prueba de oxidación-fermentación	Fermentación + oxidación +
Voges-Proskauer	El Tor + Tipo Clásico -
Prueba de halofilia con NaCl	0.0% + 3.0% + 6.0% usualmente - 8.0% - 10.0% -
Fermentación de la sacarosa	+
ONPG (o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido)	+
Fermentación de la arabinosa	-
Crecimiento a 42 °C	+

**CUADRO 10.4** Características diferenciales de especies y biotipos del género *Vibrio*.

	<i>V. cholerae</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. furnissii</i>
Crecimiento en TCBS	A	A	V	V	V	V	NC	A
Agar mCPC	P	NC	NC	NC	A	NC	NC	NC
Medio AAG	Ka	KA	KK	KA	KA	KA	Ka	KK
Crecimiento con:								
0.0% NaCl	+	-	-/d	-	-	+	-	-
3.0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+
8.0% NaCl	-	+	d	+	-	-	-	d
10.0% NaCl	-	+	d	-	-	-	-	-
Crecimiento a:								
4 °C	-	-	-	-	-	ND	ND	ND
30 °C	+	+	+	+	+	ND	ND	ND
35 °C	+	+	+	+	+	ND	ND	ND
40 °C	+	+	+	+	+	ND	ND	ND
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+
OF/glucosa	OF	OF	OF	OF	OF	OF	OF	OF
ONPG	+	-	+	-	+	+	-	+
Voges-Proskauer	d	+	-	-	-	-	-	-
Rojo de metilo	+	NC	-	NC	NC	d	-	+
Indol	+	d	-	+	d	+	+	-
Movilidad	+	+	d	-	+	+	-	+
Citrato	+	-	+	d	d	+	-	+
Arginina dihidrolasa	-	-	+	-	-	-	-	+
Descarboxilación de lisina	+	+	-	+	+	+	-	-
Descarboxilación de ornitina	+	+	-	+	+	+	-	-
Gelatinasa	+	+	+	+	+	d	-	+
Ureasa	-	-	-	D	-	-	-	-

**CUADRO 10.4** Características diferenciales de especies y biotipos del género *Vibrio*. (Continúa)

Producción de amilasa	+	+	+	+	+	ND	ND	ND
	<i>V. cholerae</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. furnissii</i>
H <sub>2</sub> S (SIM)	-	-	-	-	-	-	-	-
Utilización de D-glucosa	+	+	+	+	+	-	+	+
Gas a partir de glucosa	-	-	-	-	-	-	-	+
D-Xilosa	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinosa	-	-	+	d	-	-	+	+
D-Galactosa	+	d	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	-	-	-	-	+
Celobiosa	-	-	d	-	+	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-	d <sup>a</sup>	d	-	-
Salicina	-	-	-	-	+	-	-	-
D-Gluconato	+	+	+	+	+			
Putrescina	-	d	d	+	-			

SÍMBOLOS: TCBS, tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa; mCPC, agar celobiosa-polimixina B-colistina; modificado; AAG, agar arginina-glucosa; A, amarillo; V, verde; P, púrpura; OF, metabolismo oxidativo/fermentativo; N, no crece; K, alcalino; a, ligeramente ácido; V, reacción variable dependiendo de las especies o biotipos; S, sensible; R, resistente; d, resultados diferentes; d<sup>a</sup>, generalmente los biotipos silvestres son lac-, pero es una característica que por mutaciones se puede adquirir, existen biotipos lac- y lac+ y estos últimos son cada vez más frecuentes; +, la mayoría de las cepas +, usualmente 90% o más; -, casi ninguna cepa positiva, usualmente positivas; ND, no hay datos.

### 6.1 Prueba serológica de aglutinación

- Inocular los cultivos sospechosos presuntivos en agar tripticasa soya (TSA) e incubar a 35-37 °C durante 16 a 24 h.
- Colocar con una asa bacteriológica, dos gotas separadas de solución salina estéril (NaCl 0.85%) sobre un portaobjetos o en dos secciones de una placa para aglutinación.
- Suspender, en cada una de las gotas, una porción del cultivo desarrollado en TSA.
- Agregar a una de ellas una gota del suero anti *Vibrio cholerae* Grupo O1 subgrupo Inaba (factor AC) y mezclar con el canto del asa o empleando aplicadores de madera.
- Agitar inclinando la lámina, hacer girar las gotas durante aproximadamente un minuto.
- Observar bajo una buena iluminación y sobre un fondo oscuro la reacción.
- Considerar cualquier grado de aglutinación como positiva.
- Realizar el mismo procedimiento con el suero anti *Vibrio cholerae* Grupo O1 subgrupo Ogawa (factor AB).

La suspensión del cultivo en la que no se adicionó el suero anti *Vibrio cholerae* Grupo O1 subgrupo Inaba (factor AC) o el suero anti *Vibrio cholerae* Grupo O1 subgrupo Ogawa (factor AB) se considerará como el control negativo.

Existe la posibilidad que los antígenos anti *Vibrio cholerae* estén relacionados entre sí, por lo que se considera pertinente realizar pruebas bioquímicas para confirmar que el cultivo puro sea de *V. cholerae* O1 o no O1.

Es conveniente incluir cultivos positivos y negativos, además de los controles salinos para cada antisuero usado.

Los cultivos que aglutinan con el suero polivalente (grupo O1) y con los sueros Inaba y Ogawa, tienen los 3 factores (A, B y C) y son del serotipo Hikojima.

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

Los cultivos de *V. cholerae* cuya identidad se haya confirmado con métodos bioquímicos y que no aglutinen con el suero del grupo O1 se deben considerar como *V. cholerae* no O1.

## **EXPRESIÓN DE RESULTADOS**

Consultar los resultados obtenidos y comparar con los **cuadros 10.1, 10.2 y 10.3** para la identificación de los géneros y especies de la bacteria investigada. En caso de que los resultados obtenidos no correspondan a ninguna especie del género *Vibrio*, consultar el cuadro de la familia *Enterobacteriaceae* e intentar la identificación del problema.

Reportar presencia o ausencia de *Vibrio cholerae* (o la especie identificada) en 25.0 g o 50.0 g de alimento (según sea el caso), o en 3 L de agua o hielo.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009. Bienes y Servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. México.

Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA1-1993. Bienes y Servicios. Apéndice B. Agua purificada envasada. Especificaciones sanitarias. México. **Nota:** esta norma incluía la especificación de *Vibrio cholerae* para agua y/o hielo, pero en la actualidad está caduca. Se deja la referencia debido a que no existe norma vigente que contemple la determinación de *Vibrio cholerae* en agua y/o hielo.

Secretaría de Salud. Norma oficial mexicana NOM-243-SSA1-2010, productos y servicios. Leche, producto lácteo, producto lácteo combinado, mezcla de leche con grasa vegetal y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

Kaysner C.A. & DePaola A. Jr. (2004). *Bacteriological Analytical Manual Chapter 9: Vibrio*. Recuperado el 5 de septiembre de 2016 de: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070830.htm>.

Kaysner C.A. & DePaola A. Jr. (2015) 40. "*Vibrio*". In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 5<sup>th</sup> ed. DePaola A. & Jones J.L. APHA.

International Commission on Microbiological. *Specifications of Foods* (2005) "Microorganisms in Foods 6". Chapman & Hall. 2<sup>nd</sup> ed.



# 11

## Método para la determinación de *Listeria monocytogenes* en alimentos

---

### OBJETIVOS

- Aplicar la técnica descrita en la Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014 para detectar *Listeria monocytogenes* en alimentos.
- Conocer el fundamento de los diversos medios de cultivo empleados en la determinación de *L. monocytogenes*.
- Interpretar los resultados del análisis y sus implicaciones en la calidad del alimento.
- Aprender la forma correcta de reportar *L. monocytogenes* de acuerdo con la legislación vigente.

### GENERALIDADES

*Listeria monocytogenes* es un bacilo corto y con extremos redondeados Gram-positivo, móvil mediante flagelos, anaerobio facultativo, catalasa positivo no formador de esporas que crece bien a temperatura de refrigeración. Mide entre 0.5-2.0  $\mu$  de largo por 0.2-0.5  $\mu$  de ancho, en ocasiones puede adoptar forma de cocobacilo. Se presenta aislado, en parejas, cadenas cortas o agrupaciones en "V". Este microorganismo se destruye a temperatura de pasteurización (71.7 °C durante 15 segundos). Es extremadamente resistente en comparación con la mayoría de otras células vegetativas, ya que resiste períodos de congelamiento y descongelamiento repetitivo, incluso sobrevive a varios lapsos de deshidratación.

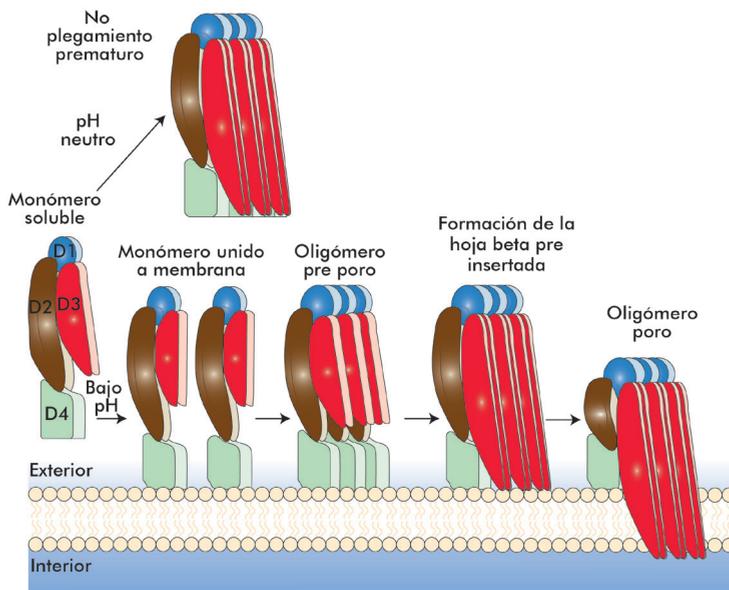
La movilidad que presenta este microorganismo se debe a flagelos peritricos y se manifiesta entre 20-25 °C. Se mueve de forma característica mediante un lanzamiento rápido combinado con saltos y rotación. Respecto a la temperatura de crecimiento, sus límites están entre 1-45 °C, con una óptima de 29-37 °C. Es una bacteria psicrótrfica, aunque a 4-5 °C su crecimiento es más lento.

*Listeria monocytogenes* se puede desarrollar en valores de pH comprendidos entre 5.0-9.0. Pasados estos límites se inhibe su crecimiento, pero sobrevive. Su pH óptimo es 7.5.

Produce hemolisina beta, característica relacionada con su patogenicidad. Una vez internalizada *Listeria monocytogenes* media su escape de la vacuola secretando una citolisina formadora de poro, conocida como *listeriolisina O* (LLO), y dos fosfolipasas que trabajan en conjunto para lisar el fagosoma.

Dentro del citosol de la célula huésped, las bacterias se replican empleando nutrientes que se consiguen a partir del mismo (incluyendo azúcares fosfato que se adquieren a través del transportador de hexosas bacteriano, Hpt, así como ácido lipoico y péptidos). Posteriormente *L. monocytogenes* se mueve a través de la célula y a las células adyacentes polimerizando la actina como una fuerza de motilidad.

Las bacterias entran en las células adyacentes y secretan LLO y fosfolipasa C (PC-PLC) para escapar de las vacuolas secundarias de doble membrana que se forman como resultado de la difusión célula a célula (ver **Figura 11.1**).



**Figura 11.1** Mecanismo de formación del poro mediado por Listeriolisina O (LLO). A pH bajo (ácido), el monómero LLO soluble interacciona con la membrana plasmática de la célula huésped, presumiblemente vinculada por colesterol. En contacto con la membrana, los reordenamientos estructurales en uno de los monómeros exponen residuos que pueden formar enlaces de hidrógeno con otros monómeros, por lo tanto, permiten la oligomerización en un complejo pre-poro. Después de la oligomerización, dos  $\alpha$ -hélices de cada monómero se extienden para formar  $\beta$ -horquillas transmembranales que perforan la membrana. Los poros formados por LLO y por otras proteínas unidas a colesterol pueden ser de 250 a 300 Å de diámetro. A pH neutro, el dominio 3 (D3) del monómero no plegado prematuramente hace que la proteína sea incapaz de formar poros (imagen modificada de Hamon *et al.*, 2006).

Se conocen siete especies del género *Listeria*, y para una de ellas dos subespecies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi* subsp. *grayi* y *L. grayi* subsp. *murrayi*.

Dentro de *L. monocytogenes* se encuentran dos grupos que corresponden a cepas hemolíticas patógenas y a cepas no hemolíticas y no patógenas. La cepa no patógena de *L. monocytogenes* se denomina como *L. innocua*. La única especie de *Listeria* patógena para el hombre es *L. monocytogenes*.

Ni *L. monocytogenes* ni *L. innocua* fermentan xilosa, *L. monocytogenes* fermenta ramnosa al igual que la mayoría de los serotipos de *L. innocua*. Estas dos espe-

cies pueden distinguirse entre sí a partir de la ausencia de actividad hemolítica en *L. innocua*, mientras que *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* presentan actividad hemolítica; aclarando que *L. seeligeri* sólo presenta una leve actividad hemolítica en placas de agar sangre de carnero después de 48 h de incubación, mientras que para *L. monocytogenes* desde las 12 h se hace evidente. Debido a que *L. innocua* comparte antígenos con *L. monocytogenes*, es necesario que para su caracterización se realicen las reacciones xilosa-ramnosa y/o patogenicidad en ratones.

La prueba Christie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP) es útil para la caracterización de las diferentes especies de *Listeria*. Básicamente esta prueba consiste en realizar siembras diametralmente opuestas, en agar sangre de carnero, tanto de *Staphylococcus aureus* hemolítico como de *Rhodococcus equi*, así como siembras en paralelo del o los cultivos a caracterizar en los ángulos correctos entre las cepas de *S. aureus* y *R. equi*, para finalmente examinar la presencia de hemólisis en las placas tras haber incubado a 36 °C durante 12-18 horas.

La hemólisis del *L. monocytogenes* se incrementa en la zona influenciada por el *S. aureus*. Por el contrario, la hemólisis del *L. ivanovii* se incrementa cerca del *R. equi*. También *L. seeligeri* puede dar reacción débilmente positiva, pero sólo después de 48 h de incubación. Las demás especies permanecen como no hemolíticas. La hemólisis puede interpretarse con mayor facilidad cuando las placas de agar sangre están recién preparadas y con las capas más delgadas de lo usual. Se recomienda no olvidar incluir el uso de testigos.

Otra consideración importante para recuperar *L. monocytogenes* es la refrigeración de las muestras a 4 °C durante la manipulación y almacenamiento hasta el arribo al laboratorio donde se analizarán, ya que a esta temperatura se propicia el desarrollo del microorganismo, aunque de forma lenta. Si la muestra está congelada, deberá permanecer así hasta la realización del análisis.

Las pruebas clásicas para definir la patogenicidad de la *Listeria* incluyen, entre otras, la prueba de Antón en conejos, inyecciones intraperitoneales en ratones e inoculación de embriones de pollo.

Debido a que todas las especies patógenas, exceptuando *L. welshimeri*, comparten uno o más antígenos somáticos con *L. monocytogenes*, es necesario caracterizar bioquímicamente las cepas antes de realizar las prueba inmunológicas.

La listeriosis es el nombre de la enfermedad provocada por la ingesta de alimentos contaminados con *L. monocytogenes*. Para que se presente listeriosis, es necesario ingerir los microorganismos vivos. Los síntomas de la enfermedad se caracterizan por inflamación de las meninges con o sin septicemia. Al inicio de la enfermedad se presenta fiebre repentina, avanzando con intenso dolor de cabeza, náusea, vómito, delirio y finalmente puede sobrevenir el coma, sobre todo en personas mayores, inmunocomprometidas, infantes y mujeres embarazadas. En estas últimas puede causar aborto. El grado de fatalidad es del  $30 \pm 1\%$ ; sin embargo, en otro tipo de huéspedes suele causar fiebre, que va desde ligera hasta severa, así como síntomas parecidos a un resfriado común.

La forma de acción del microorganismo consiste en invadir el epitelio gastrointestinal. Una vez que el microorganismo ha logrado penetrar a los monocitos, macrófagos o leucocitos polimorfonucleares del huésped, empieza la septicemia y se multiplica. Su presencia intracelular en los fagocitos también permite la diseminación del microorganismo al cerebro y probablemente exista migración transplacentaria al feto en mujeres embarazadas. La patogenicidad de *L. monocytogenes* recae en su habilidad para sobrevivir y multiplicarse en células fagocíticas del huésped.

La fuente de este microorganismo son los animales domésticos y salvajes infectados, aves de corral y humanos, también se puede encontrar en agua y lodo. La utilización de ensilaje estacional en ocasiones es seguida por un incremento de listeriosis en animales, lo que hace suponer que tanto la leche como los productos del campo pueden estar contaminados. Además, algunos estudios sugieren que del 1 al 10% de los humanos son portadores asintomáticos de *L. monocytogenes* en el intestino.

Su transmisión se asocia con el consumo de verduras y productos lácteos contaminados, particularmente variedades de quesos no madurados o elaborados con leche bronca y helados, así como salchichas fermentadas crudas, carnes crudas, pollo crudo y cocido y pescado crudo y ahumado.

La dosis infectiva está relacionada con la susceptibilidad del huésped. Así, para individuos susceptibles la infección ocurre con 100 células, mientras que personas no susceptibles resisten hasta 10 000 000 células.

Como medidas de control para evitar la listeriosis a través del consumo de alimentos contaminados, se recomienda, sólo por mencionar algunas, lo siguiente: pH bajo, tratamiento térmico adecuado, evitar la recontaminación y un  $A_w$  bajo.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el problema de la *Listeria* no está en impedir su presencia, sino en controlar su supervivencia y crecimiento, con el fin de reducir las cantidades en que se encuentran en los alimentos.

## **FUNDAMENTO**

El método para detectar la presencia de *L. monocytogenes* se basa en el aislamiento y diferenciación de especies de *Listeria* spp., principalmente utilizando la inhibición selectiva de los componentes dentro de la formulación de los medios de cultivo propuestos, así como el sistema de indicador esculina y hierro (II). La diferenciación de las especies de este género se sustenta en la fermentación de carbohidratos y la actividad hemolítica.

## **MEDIOS DE CULTIVO**

- 1 matraz Erlenmeyer con 250.0 ml de caldo Fraser **media concentración**.<sup>a</sup>
- 1 tubo con 10.0 mL de caldo Fraser (concentración completa).<sup>b</sup>
- 4 cajas de medio Oxford (OXA) (utilizar 2 cajas/día).<sup>b, c</sup>
- 4 cajas de agar PALCAM (utilizar 2 cajas/día).<sup>b, c</sup>
- 10 cajas de agar soya tripticaseína con 0.6% de extracto de levadura (ASTEL) (utilizar 5 cajas/día), o bien, utilizar sólo 2 cajas de ASTEL (utilizar 1 caja/día) y realizar las siembras en al menos 5 cuadrantes diferentes.<sup>c, d</sup>
- 5-10 tubos con 3.5 mL de caldo soya tripticaseína con 0.6% de extracto de levadura (CSTEL).<sup>d, e</sup>
- 1-2 cajas recién preparadas de agar sangre de carnero al 5% con una capa más delgada de lo usual (para la prueba de CAMP).<sup>f</sup>
- 5 tubos con 3.5 mL con agar de movilidad sin inclinar (ver formulación en el [Anexo 1 Medios de cultivo](#)).<sup>f</sup>
- 5 tubos con 3.5 mL de caldo púrpura con 0.5% de ramnosa.<sup>f</sup>
- 5 tubos con 3.5 mL de caldo púrpura con 0.5% de xilosa.<sup>f</sup>

### **EQUIPO Y MATERIAL**

- Aceite de inmersión.<sup>c, d</sup>
- Asas bacteriológicas.<sup>b, c, d, e, f</sup>
- Cubreobjetos.<sup>c, d</sup>
- Lámpara de luz blanca.<sup>c, d</sup>
- Pipetas estériles con algodón de 1.0, 10.0 y 25.0 mL.<sup>a, b, c, d, e, f</sup>
- Pipetas Pasteur estériles.<sup>a, b, c, d, e, f</sup>
- 1 propipeta.<sup>a, b, c, d, e</sup>
- Portaobjetos escabado.<sup>e</sup>
- 1 mechero Bunsen.<sup>a, b, c, d, e, f</sup>
- Incubadora a  $25 \pm 1$  °C,  $30 \pm 1$  °C y a  $36 \pm 1$  °C.<sup>a, b, c, d, e, f</sup>
- Cucharas estériles u otros instrumentos apropiados para transferir muestras de alimentos.<sup>a</sup>
- Balanza.<sup>a</sup>
- Microscopio de contraste de fase con un objetivo 100X.<sup>c, d, e</sup>
- Licuadora o Stomacher®.<sup>a</sup>
- Cajas de Petri.<sup>e</sup>

### **REACTIVOS Y SOLUCIONES**

- Solución de cloruro de litio
- Solución de ácido nalidíxico
- Solución de clorhidrato de acriflavina
- Solución de citrato, amonio hierro III
- Solución de polimixina B
- Solución de ceftazidima sódica pentahidratada
- Colorantes para la tinción Gram
- Solución de peróxido de hidrógeno al 3% para la prueba de catalasa
- Aceite de inmersión

**NOTAS**

- <sup>a</sup> Material necesario al inicio de la práctica.
- <sup>b</sup> Material necesario a las 24 horas de iniciada la práctica.
- <sup>c</sup> Material necesario a las 72 horas de iniciada la práctica.
- <sup>d</sup> Material necesario a las 120 horas de iniciada la práctica.
- <sup>e</sup> Material necesario a las 144 horas de iniciada la práctica.
- <sup>f</sup> Material necesario a las 168 horas de iniciada la práctica.

MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS PARA EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS

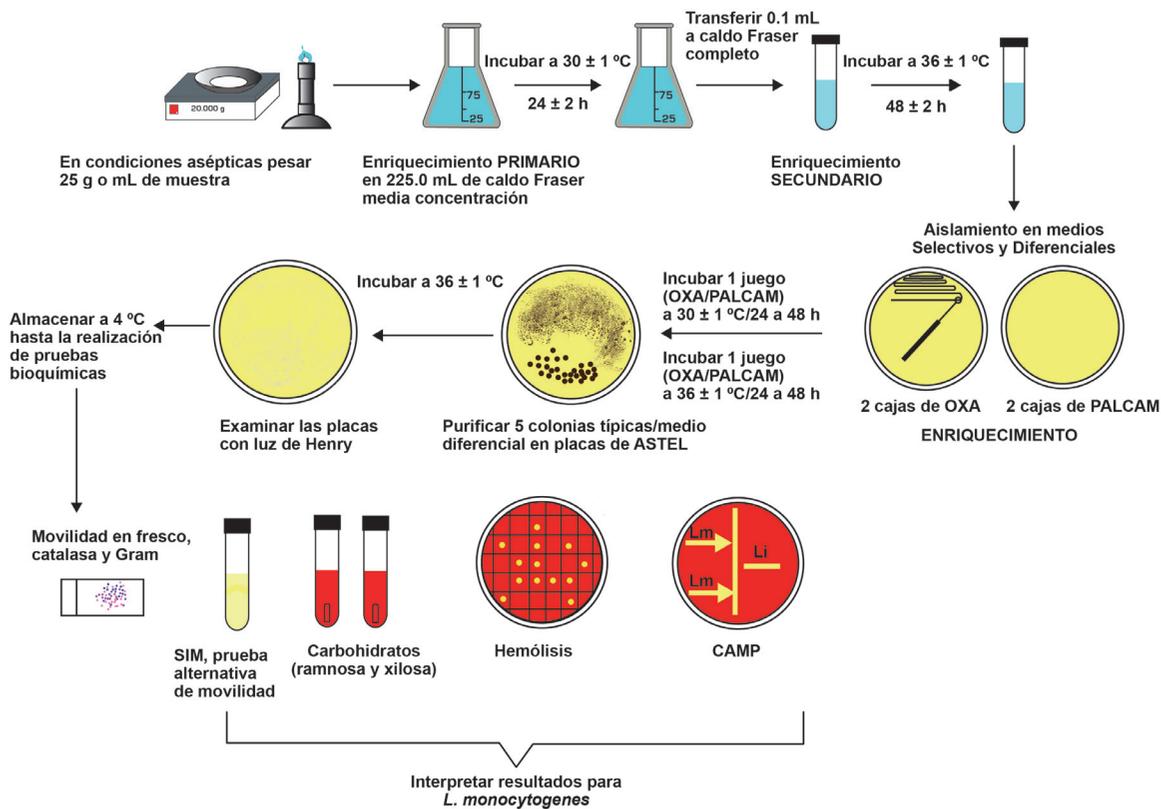


Figura 11.2 Determinación de *Listeria monocytogenes* en alimentos.

## **PROCEDIMIENTO**

### **1. Enriquecimiento primario**

- Tomar una muestra representativa del alimento, tanto de la superficie externa como del interior.
- Colocar 25.0 mL o 25.0 g de la muestra en un recipiente que contenga 225.0 mL de caldo Fraser **media concentración**, homogeneizar e incubar a  $30 \pm 1$  °C por  $24 \pm 2$  h.

### **2. Enriquecimiento secundario**

- Transferir 0.1 mL del enriquecimiento primario después de la incubación inicial a un tubo conteniendo 10.0 mL de caldo Fraser (**concentración completa**). Incubar a  $36 \pm 1$  °C por  $24 \pm 2$  h.

### **3. Siembra en medios selectivos e identificación**

- Del enriquecimiento primario, inocular 2 placas de medio Oxford y 2 placas de agar PALCAM. Invertir las placas e incubar un juego de agar Oxford y PALCAM a 30 °C por 24 h, incubar otro juego de agar Oxford y PALCAM a 36 °C por 24 h, en caso de crecimiento pobre o nulo, incubar hasta por 48 h.
- Del enriquecimiento secundario, inocular 2 placas de medio Oxford y 2 placas de agar PALCAM. Invertir las placas e incubar un juego de agar Oxford y PALCAM a 30 °C por 24 h, incubar otro juego de agar Oxford y PALCAM a 36 °C por 24 h, en caso de crecimiento pobre o nulo, incubar hasta por 48 h.
- En el medio OXA, las colonias de *Listeria* son pequeñas, grisáceas a negras, con halo oscuro. Algunas colonias pueden aparecer con un tono café oscuro, que se define mejor después de 48 h de incubación, posible brillo verdoso y centros hundidos.
- En el agar PALCAM, las colonias de *Listeria* a las 24 h de incubación se observan como colonias muy pequeñas, grisáceas o de un verde olivo de aproximadamente 1.5 mm a 2 mm de diámetro, a veces con centros negros, pero siempre con halos oscuros. Después de 48 h las colonias de *Listeria* spp. se observan de color verde y un tamaño aproximado de 1.5 a 2 mm de diámetro, con el centro hundido y rodeadas de un halo negro.
- Seleccionar cinco o más colonias típicas del medio OXA y PALCAM. Aislar en placas de medio ASTEL. Este paso es importante debido a que las colonias

aparentemente aisladas en los medios OXA y PALCAM pueden estar contaminadas con microbiota competitiva parcialmente inhibida, invisible a simple vista. Incubar a  $36 \pm 1$  °C por 18-24 h o hasta por un máximo de 72 h.

- Las colonias típicas de *Listeria* spp. en agar ASTEL se observan de 1-2 mm de diámetro, convexas, incoloras y opacas con borde entero. Si no se obtiene un buen aislamiento proceder a sembrar nuevamente otra colonia típica a partir de los medios selectivos.
- Prueba de carácter informativo. Observar el crecimiento en las placas de ASTEL con luz blanca en un ángulo de 45° (iluminación de Henry), a simple vista o con la ayuda de una lupa. En este medio generalmente aparecen las colonias de color azul-gris a azul.
- Debido a que puede estar presente más de una especie de *Listeria* en la muestra, deben identificarse como mínimo cinco colonias de cada medio selectivo.

#### 4. Identificación

- Se deben utilizar cepas de referencia positivas y negativas para cada una de las pruebas. *L. innocua* (ATCC 33090), *L. ivanovii* (ATCC 19119), *L. monocytogenes* (ATCC 19115), *Staphylococcus aureus* hemolítico (ATCC 49444, ATCC 25923 o CIP 5710) y *Rhodococcus equi* (ATCC 6939 o NCTC 1621).
- Los cultivos en agar ASTEL se pueden mantener a 4 °C y utilizar como inóculo para realizar las pruebas de identificación.

##### 4.1. Movilidad en fresco

- Hacer preparaciones en fresco a partir de un cultivo líquido, CSTEEL, inoculado a partir del cultivo en agar ASTEL e incubado a  $25$  °C  $\pm$  1 °C durante 8-24 h. La suspensión debe ser densa y emulsificarse completamente, observar con objetivo 10X o 40X en un microscopio de contraste de fase o microscopio de campo oscuro.
- Las células de *Listeria* spp. son bacilos cortos con movilidad rotatoria (*tumbling*).
- Los bacilos con movimientos rápidos no son *Listeria* spp.

## 4.2. Prueba alternativa de movilidad

- Utilizando un asa recta, inocular agar de movilidad picando una colonia obtenida en ASTEL. Incubar a  $25 \pm 1$  °C por 48 h. Examinar el crecimiento alrededor de la picadura. Debido al típico movimiento de *Listeria* spp. como resultado se observará un crecimiento característico en forma de sombrilla. Si el crecimiento no es suficiente, incubar por 5 días adicionales y observar la picadura al término del tiempo.

## 4.3. Prueba de catalasa

- Emulsificar un cultivo puro, con una gota de solución de peróxido al 3%.
- La formación inmediata de burbujas indica que la prueba es positiva.
- Las especies de *Listeria* son catalasa positiva.
- **Precauciones:** la agitación del reactivo con la suspensión del microorganismo debe hacerse con un asa de plástico o palillo de madera estéril, evitando el contacto con el reactivo. Si se utiliza un cultivo procedente de agar sangre para realizar esta prueba, no retirar el agar con el asa al tomar la colonia, debido a que los eritrocitos del agar sangre darán un falso positivo de la prueba.

## 4.4. Tinción de Gram

- Hacer una tinción de Gram de cultivos de 16 a 24 h. Todas las especies de *Listeria* son bacilos cortos Gram positivo; sin embargo, en cultivos viejos pueden presentarse como formas cocoides.

## 4.5. Hemólisis

- Dibujar una cuadrícula de 20 a 25 espacios en el fondo de la placa de agar sangre de carnero al 5%. Inocular por picadura un cuadro por cada cultivo a caracterizar. Incubar a  $36 \pm 1$  °C por  $24 \pm 2$  h. Observar la reacción hemolítica en las placas. *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* producen una zona ligeramente clara alrededor del punto de picadura (hemólisis  $\beta$ ), *L. innocua* no muestra zona de hemólisis, mientras que *L. ivanovii* usualmente produce una zona ancha, clara y delimitada de hemólisis  $\beta$ .

#### 4.6. Prueba de utilización de carbohidratos (ramnosa y xilosa)

- Inocular tubos con caldo púrpura para fermentación de carbohidratos al 0.5% de ramnosa y xilosa. Incubar a  $35 \pm 1$  °C hasta por 5 días. Una coloración amarilla indica fermentación del carbohidrato probado. Consultar el **Cuadro 1** para reacciones con ramnosa y xilosa.

#### 4.7 Prueba de CAMP para *Listeria monocytogenes*

- Sembrar *Staphylococcus aureus* hemolítico (ATCC 49444, ATCC 25923 o CIP 5710) y *Rhodococcus equi* (ATCC 6939 o NCTC 1621) en paralelo y diametralmente opuestos en agar sangre de carnero recién preparadas y con una capa más delgada de lo usual. Estriar perpendicularmente las colonias seleccionadas a caracterizar, entre las cepas de *S. aureus* y *R. equi*.
- Incubar a  $36 \pm 1$  °C por 12-18 h y examinar la hemólisis en las placas.
- La hemólisis de *L. monocytogenes* se incrementa en la zona influenciada por *S. aureus*; la hemólisis de *L. ivanovii* se incrementa cerca de *R. equi*, y *L. seeligeri* es débilmente hemolítico cerca de *S. aureus* después de 48 h de incubación. Las otras especies permanecen como no hemolíticas.
- No olvidar incluir testigos de *Listeria* spp. en otra caja de agar sangre de carnero lo más fresca posible. Utilizar *L. innocua* (ATCC 33090), *L. ivanovii* (ATCC 19119) y *L. monocytogenes* (ATCC 19115).



**Figura 11.3** Agar sangre para la prueba de CAMP para *L. monocytogenes*, *R. equi* y *S. aureus*.

**EXPRESIÓN DE RESULTADOS**

Todas las especies de *Listeria* spp. son colonias pequeñas, bacilos Gram positivo con movilidad rotativa y catalasa positiva. Comparar los resultados obtenidos con el **Cuadro 1.11** y determinar el género y especie de las cepas aisladas.

**CUADRO 11.1** Diferenciación de las especies de *Listeria*.

Especies	Hemolítico (beta)	Producción de ácidos de		CAMP	
		R	X	S.a	R.e
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. grayi</i> subs. <i>Murrayi</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L. grayi</i> subs. <i>grayi</i>	-	-	-	-	-

V reacción variable

R Ramnosa

X Xilosa

S.a *Staphylococcus aureus*

R.e *Rhodococcus equi*

(+) Reacción débil

+ > 90% de reacción positiva

- sin reacción

**Nota:** existen cepas extrañas de *L. monocytogenes*, las cuales no muestran  $\beta$  hemólisis o una reacción positiva a la prueba de CAMP, bajo las condiciones descritas en el presente método.

**INFORME DE LA PRUEBA**

Reportar presencia o ausencia en 25.0 g o 25.0 mL de muestra.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014. Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Apéndice C Normativo. Método de referencia para el aislamiento de *Listeria monocytogenes*. Diario Oficial de la Federación, 26 junio 2016. México. Recuperado el 26 junio de 2016 de [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015)
- Food and Drug Administration (2015). "Bacteriological Analytical Manual Online (BAM)". Recuperado el 8 de septiembre de 2016 de [www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm114664.htm](http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm114664.htm)
- International Standard ISO 11290 (1996). Microbiology of food and animal feeding stuffs –Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: Detection method. 1<sup>st</sup> ed.
- Ryser E.T. & Donnelly C.W. (2001). *Listeria*. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4<sup>th</sup> ed. Downs F.P. & Ito K. (Eds.) APHA. Washington. 343-356.
- Baud D., Greub G. (2011). Intracellular bacteria and adverse pregnancy outcomes. *Clin Microb & Infect.* 17 (9): 1312-1322.



# 12

## Métodos alternativos de pruebas convencionales de análisis microbiológicos

---

### **OBJETIVO**

- Conocer y aplicar métodos alternativos para el análisis microbiológico de los alimentos.
- Comparar las ventajas y desventajas en el uso y aplicación de los métodos alternativos respecto a los métodos tradicionales oficiales.
- Explicar el fundamento de los métodos alternativos y establecer la diferencia de los mismos respecto a la metodología tradicional.

### **GENERALIDADES**

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son cada día más difíciles de controlar y evitar. Para verificar la inocuidad de los alimentos, los tecnólogos de alimentos realizan con frecuencia análisis microbiológicos. Los métodos tradicionales han sido una herramienta para monitorear la calidad microbiológica de los productos alimenticios procesados y las materias primas. Sin embargo, estos métodos aunque son procedimientos eficaces, algo sensibles y rutinarios, consumen mucho tiempo debido a que involucran numerosos pasos, desde el enriquecimiento hasta la confirmación serológica, además de utilizar una gran cantidad de material y equipo. Por ello han surgido diferentes métodos para aumentar la eficiencia del análisis y acortar los tiempos, con la finalidad de emitir un diagnóstico oportuno sobre la detección e identificación de microorganismos indicadores y patógenos. Estos métodos llamados *rápidos*, se definen como “cualquier método destinado a la detección, recuento, caracterización y la subtipificación de microorganismos (patógenos y de deterioro), los cuales son muy específicos, sensibles, precisos y requieren menos tiempo y trabajo en comparación con los métodos convencionales”.

Los métodos rápidos se basan en las propiedades metabólicas de los microorganismos, debido a la utilización de diferentes carbohidratos, producción de enzimas específicas y/o algunos compuestos. Para la identificación de estos productos de reacción, se utilizan: **técnicas físico-químicas** (películas de medios de cultivo deshidratados generales o selectivos, sistemas para determinar el número más probable, medios cromogénicos y fluorogénicos), **pruebas bioquímicas** (galerías miniaturizadas y automatizadas), **inmunológicas** (precipitación, aglutinación, inmunofluorescencia, citometría, radioinmunoensayo, enzimoimmunoensayo, inmunocromatografía, nefelometría, inmunomicroscopía) y **moleculares** (hibridación, PCR de punto final, PCR en tiempo real, ribotipificación, microarrays, biochips).

Muchos de estos métodos han sido validados por organismos independientes. En México, los métodos alternativos no están aprobados; sin embargo, la tendencia en otros países es usarlos como métodos oficiales, por lo que se deben considerar como parte rutinaria en la industria de alimentos.

De manera general, el uso de métodos alternativos en alimentos se ha tenido que enfrentar a varios retos, entre los que destacan: las características heterogéneas de los alimentos, es decir, el exceso de nutrientes, tales como grasas y proteínas que dificultan su análisis, en ocasiones el color del alimento ocasiona también una dificultad de interpretación. Los métodos automatizados requieren un espacio amplio, mientras que otros son bastante sofisticados y se utilizan sobre todo en laboratorios especializados. Cada método alternativo puede llegar a tener desventajas, sin embargo, es parte del tecnólogo de alimentos priorizar el uso o no de algunos de los métodos para garantizar la inocuidad de los alimentos.

En esta sección se estudiarán algunos de los métodos alternativos que se han desarrollado y que muestran ser una herramienta útil en el análisis microbiológico de los alimentos, de acuerdo con las características de éstos y el tipo de microorganismo que requiera determinarse su presencia.

## I. MÉTODOS ALTERNATIVOS DE CUANTIFICACIÓN

### I.I. Método de placas 3M™ PETRIFILM™

#### **OBJETIVOS**

- Realizar adecuadamente la técnica de conteo microbiológico alternativo en placas 3M™ Petrifilm™ para diversos grupos microbianos de importancia en alimentos.
- Interpretar adecuadamente los resultados de la cuenta en placa 3M™ Petrifilm™ y sus implicaciones en la calidad del alimento.

#### **GENERALIDADES**

Las placas Petrifilm™ constan de dos películas plásticas delgadas de 10 x 12 cm, donde la primera es un papel plástico cuadrículado que contiene un gel soluble en agua fría y un medio de cultivo deshidratado compuesto de nutrientes, sustratos cromogénicos, antibióticos e indicadores (esta composición es variable y depende del microorganismo que se requiera detectar o identificar). La segunda película es un film plástico que cubre los componentes de la primera película, en cuya parte interior contiene gel soluble en agua fría y un indicador de óxido-reducción para la tinción de las colonias desarrolladas. Las placas 3M™ Petrifilm™ están avaladas por la AOAC, ocupan poco espacio al incubarse las muestras, por el tamaño delgado de las placas se reducen los desechos biológicos, tienen una vida útil de 1 a 2 años almacenadas en frío.

#### **FUNDAMENTO**

- **3M™ Petrifilm™ AC placas para el recuento de aerobios totales**

Las placas Petrifilm™ para recuento de aerobios totales AC (Aerobic Count) son un medio de cultivo listo para ser empleado, cuya composición del medio contiene nutrientes del agar Standard Methods, un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador de color rojo (cloruro de trifeníl tetrazolio, TTC) donde la enzima deshidrogenasa en la membrana de las bacterias se asocia al TTC y los iones H+

se liberan reduciendo el TTC a *formazan*, que colorea las colonias de rojo. En las placas Petrifilm™, el indicador TTC está inmerso en el adhesivo y se libera con el tiempo, dando oportunidad a que las bacterias crezcan y después interaccionen con el indicador, reduciendo así el potencial tóxico.

Las placas 3M™ Petrifilm™ enumeran la flora total aeróbica presente en la muestra. Según la AOAC, determinan la población de bacterias aerobias en 48 h para recuento de microorganismos aerobios. Esta placa puede usarse también para verificación de bacterias lácticas.

Los resultados rápidos y precisos se muestran en tres etapas: 1) se inocula fácilmente, se levanta la película y se añade la muestra, 2) requieren un mínimo espacio de incubación en estufa, 3) para el conteo de UFC un pigmento tiñe las colonias de rojo.

- **3M™ Petrifilm™ CC placas para el recuento de coliformes**

Estas placas Petrifilm™ están especialmente recomendadas para detectar coliformes en todos los alimentos en un bajo número. Las placas Petrifilm™ CC contienen los nutrientes del medio bilis rojo violeta (VRB) modificado, un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador cloruro de tetrazolio que facilita la enumeración de colonias. El film superior atrapa el gas producido por la fermentación de la lactosa por los coliformes.

La ISO define los coliformes por su capacidad de crecer en medios específicos y selectivos. El método ISO 4832, que enumera los coliformes por la técnica del recuento de colonias, define los coliformes por el tamaño de la colonia y la producción de ácido en el agar VRB con lactosa (VRBL). En las placas Petrifilm™ CC, los coliformes productores de ácido se muestran como colonias rojas con o sin gas. El método ISO 4831, que enumera los coliformes por el método del número más probable (NMP), define los coliformes por su capacidad de crecer y producir gas a partir de la lactosa en un caldo selectivo. En las placas Petrifilm™ CC, estos coliformes se muestran como colonias rojas asociadas a gas.

- **3M™ Petrifilm™ EC placas para el recuento de *Escherichia coli***

Esta placa Petrifilm™ permite el recuento y la diferenciación entre *Escherichia coli* y coliformes. Contiene los nutrientes del agar bilis rojo violeta modificado, un agente solidificante que es soluble en agua fría, el indicador redox tricloruro de tetrazolio (TTC) y el indicador cromogénico 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucuronido que indica la presencia de la enzima glucuronidasa. La diferenciación de

*E. coli* se logra debido a que el 97% de las especies producen  $\beta$ -glucuronidasa, que al hidrolizar el compuesto cromogénico producen un precipitado azul asociado a la colonia. La película superior atrapa el gas producido por los coliformes y *E. coli* que fermentan la lactosa. Cerca del 95% de las *E. coli* producen gas, indicado por las colonias de color rojo a azul asociadas con el gas atrapado sobre la placa Petrifilm™ EC (con el diámetro aproximado de una colonia).

La AOAC International y el Bacteriological Analytical Manual (BAM) de la FDA definen a los coliformes como bacilos gram negativos que producen ácido y gas, debido a la utilización de la lactosa durante la fermentación metabólica. Las colonias de coliformes desarrolladas en la placa Petrifilm™ EC producen ácido, el cual ocasiona que el indicador de pH coloree el gel de rojo oscuro. El gas atrapado alrededor de las colonias de coliformes indica coliformes confirmados.

- **3M™ Petrifilm™ YM placas para el recuento de mohos y levaduras**

Las placas Petrifilm™ YM (Yeast & Mold) para levaduras y mohos permiten el recuento y la diferenciación entre ambos tipos de microorganismos. Se fundamenta en la composición del medio selectivo Sabouraud, además de contener los antibióticos cloranfenicol y gentamicina, así como el indicador 5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato que permite identificar la presencia de la fosfatasa, enzima que está asociada a la membrana de las levaduras, por lo que las colonias pueden ser de color beige/crema hasta verde/azuladas, mientras que las colonias de los mohos son de color variable, con bordes difusos. La placa presenta una cuadrícula impresa que facilita el recuento rápido y preciso de las colonias.

Las placas 3M™ Petrifilm™ YM identifican mohos y levaduras en productos alimenticios, superficies y ambientes. Los resultados se muestran rápidos y precisos, de 3 a 5 días, en tres pasos sencillos: 1) Inoculación: levantar la película y añadir la muestra, 2) Incubación: el diseño de las placas ahorra espacio en la estufa, 3) Conteo: las levaduras aparecen normalmente como colonias pequeñas verde-azuladas con bordes definidos y sin foco central. Los mohos suelen mostrarse como colonias grandes, de color variable, con bordes difusos y foco central. Una cuadrícula impresa en la placa facilita el recuento rápido y preciso de las colonias.

El tiempo y temperatura adecuada de incubación es importante para asegurar el crecimiento de los tipos de levaduras y mohos que pueden causar alteraciones. Estas levaduras y mohos crecen generalmente despacio y son sensibles a altas

temperaturas, sin tener en cuenta el método usado. Como las colonias de mohos crecen entre los films, la lectura de las placas Petrifilm™ no originará colonias adicionales a partir de nuevas esporas. La incubación de las placas a una temperatura más alta de la indicada no implica un resultado más rápido, sino que puede significar un resultado inexacto.

Las levaduras y mohos son organismos muy diversificados y no siempre pueden ser distinguidos unos de otros macroscópicamente. Como cualquier otro método, se puede hacer una diferenciación con un examen microscópico.

### **MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES**

- 1 matraz Erlenmeyer de 250 mL de capacidad, con 90.0 mL de solución amortiguadora de fosfatos o agua peptonada al 0.1% o solución salina isotónica (SSI) al 0.85%.<sup>a</sup>
- 4 a 6 tubos de ensayo con tapón de rosca, conteniendo 9.0 mL de solución amortiguadora de fosfatos o agua peptonada al 0.1% o solución salina isotónica (SSI), al 0.85%.<sup>a</sup>
- Placas 3M™ Petrifilm™ AC para el recuento de aerobios totales.
- Placas 3M™ Petrifilm™ CC para el recuento de coliformes.
- Placas 3M™ Petrifilm™ EC para el recuento de *E. coli* / coliformes.
- Placas 3M™ Petrifilm™ YM para el recuento de mohos y levaduras.

### **MATERIAL Y EQUIPO**

- Balanza granataria.<sup>a</sup>
- Bolsas estériles para Stomacher® de calibre grueso o bolsas de cierre hermético de 25 x 35 cm.<sup>a</sup>
- Utensilios estériles (cuchillo, tenedor, cuchara, pinzas) para la toma de la muestra.<sup>a</sup>
- Pipetas serológicas de 10 mL estériles, con algodón en el extremo superior (las necesarias de acuerdo con el número de diluciones).<sup>a</sup>
- Pipetas serológicas de 1 mL, estériles, con algodón en el extremo superior (las necesarias de acuerdo con el número de diluciones), o micropipeta de 100 a 1000 µL con puntas azules estériles.<sup>a</sup>

- Pipetas Pasteur estériles.<sup>a</sup>
- Stomacher® (homogeneizador peristáltico) o motor de licuadora con vaso esterilizado.<sup>a</sup>
- Mechero.<sup>a</sup>
- Vortex.<sup>a</sup>
- Difusores.<sup>a</sup>
- Incubadora a  $35 \pm 2$  °C.<sup>a</sup>
- Incubadora a  $25 \pm 1$  °C.<sup>a</sup>
- Contador de colonias de campo oscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador.<sup>b</sup>

## **NOTA**

<sup>a</sup> Material necesario al inicio de la práctica.

<sup>b</sup> Material necesario a las 24-48 h de iniciada la práctica.

No usar soluciones amortiguadoras que contengan citrato, bisulfito o tiosulfato, ya que pueden inhibir el crecimiento.

Conservar las bolsas cerradas con las placas Petrifilm™ a  $\leq 8$  °C, antes de la fecha de caducidad impresa en la bolsa. En zonas con alta humedad donde puede haber condensación, es mejor dejar que las bolsas alcancen la temperatura ambiente antes de abrirlas, para cerrar las bolsas que se están utilizando, doblar los extremos y cerrarlos perfectamente, mantener las bolsas una vez cerradas a  $\leq 25$  °C, a HR  $\leq 50\%$ , no refrigerar las bolsas abiertas, usar las placas Petrifilm™ antes de un mes desde su apertura.

## **PROCEDIMIENTO**

### **1. Preparación de la muestra**

- En condiciones asépticas, pesar o pipetear el producto alimenticio en un contenedor estéril adecuado, como una bolsa tipo Stomacher®, frasco de dilución, bolsa Whirl-Pak® o cualquier otro contenedor estéril.
- Si es necesario, utilizar diluyentes estériles apropiados: agua peptona sal, tampón fosfato de Butterfield (tampón fosfato IDF,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 0.0425 g/L, ajustar

pH a 7.2), agua peptonada al 0.1%, agua peptonada con amortiguador tamponada, solución salina isotónica (0.85 - 0.90%), caldo Letheen sin bisulfito o agua destilada.

- Mezclar u homogeneizar la muestra según el procedimiento habitual para la preparación de las diluciones requeridas (ver protocolo de [\*\*Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico\*\*](#)).

## 2. Inoculación de las placas 3M™ Petrifilm™

- Distribuir las placas sobre la mesa de trabajo, verifique que la zona de trabajo esté plana y nivelada. Identificar y marcar las placas con los datos pertinentes antes de colocar el inóculo, se recomienda inocular cada dilución por duplicado. Levante la lámina semitransparente superior.
- Inocular 1.0 mL de la dilución correspondiente, con la micropipeta o pipeta estéril, colocando la pipeta perpendicular a la placa Petrifilm™.
- Dejar caer libremente la película semitransparente sobre la base de la placa.
- Distribuir con el difusor el volumen del inóculo, de manera que el lado rugoso quede hacia abajo y el inóculo se difunda en el área del círculo, cubriendo totalmente la muestra.
- Presionar suavemente por unos segundos el difusor (**figuras 12.1 y 12.2**) para distribuir la muestra sobre el área circular. **No gire ni deslice el difusor.** Recuerde distribuir la muestra antes de inocular la siguiente placa.
- Retirar el difusor o dispersor. Esperar por lo menos 1 minuto a que se solidifique el gel y proceder a la incubación.

## 3. Incubación

- Incube las placas cara arriba en grupos de no más de 20 piezas. Puede ser necesario humectar el ambiente de la incubadora con un pequeño recipiente con agua estéril, para minimizar la pérdida de humedad.

**CUADRO 12.1** Condiciones de incubación para las placas 3M™ Petrifilm™.

Tipo de placa Petrifilm™	Temperatura y tiempo de incubación
Aerobios totales AC	37 ± 1 °C por 24 h ± 2 h
Coliformes totales CC	37 ± 1 °C por 24 h ± 2 h
<i>Escherichia coli</i> EC	42 ± 1 °C por 24 h ± 2 h
Mohos y levaduras YM	25 ± 1 °C durante 3 a 5 días

## RESULTADOS

- Las placas Petrifilm™ pueden ser contadas en un contador de colonias estándar u otro tipo de lupa con luz.
- Las colonias pueden ser aisladas para su identificación posterior. Levante la película superior y recoja la colonia del gel.

### 1.1. Interpretación para cuenta de bacterias aerobias totales (placa AC)

- El tinte indicador rojo que se encuentra en la placa colorea las colonias para su mejor identificación. Cuente todas las colonias rojas sin importar su tamaño o la intensidad del tono rojo.
- El intervalo recomendado de conteo en la placa Petrifilm™ AC está entre **25 a 250 colonias**.
- Cuando el número de colonias es mayor a 250 por su excesivo crecimiento, los conteos deben ser estimados. Determinar el promedio de colonias en un cuadrado (1 cm<sup>2</sup>) y multiplíquelo por 20 para obtener el conteo total por placa. El área de inoculación del Petrifilm™ AC es de 20 cm<sup>2</sup>.
- Con conteos muy altos, el área total de crecimiento puede virar o colorearse rosa. Se pueden observar colonias individuales sólo en el filo o borde del área de crecimiento. Registrar este conteo como muy numeroso para contar (MNPC).

## NOTA

Debido a que en las placas Petrifilm™ AC las colonias de aerobios se tiñen de rojo, se las puede diferenciar de partículas o residuos de producto, ya que éstos tienen una forma irregular y color opaco.

### 2.1. Interpretación de resultados para la cuenta de coliformes (placa CC)

- Contar todas las colonias rojas con gas. Algunas veces el gas deforma la colonia y hace que la colonia “perfile” la burbuja. Estas burbujas de gas tienen aproximadamente el diámetro de una colonia.
- El intervalo óptimo de lectura de las colonias totales en placa Petrifilm™ CC es de **15 a 150 colonias**.
- El área de crecimiento circular de la placa Petrifilm™ CC es de aproximadamente 20 cm<sup>2</sup>. Se pueden hacer estimaciones en placas con más de 150 colonias contando el número de colonias en uno o varios cuadros representativos y obteniendo el promedio. Multiplicar dicho número por 20 para obtener el recuento estimado por placa Petrifilm™ CC.
- Cuando un alto número de microorganismos no-coliformes, como *Pseudomonas* están presentes en las placas Petrifilm™ CC, el gel puede virar a amarillo.

### 3.1. Interpretación de resultados para el recuento de *E. coli* (placa EC)

- Conforme la cuenta de *E. coli* y coliformes se incrementa, el color del gel se torna desde rojo oscuro hasta azul púrpura.
- Las burbujas del fondo son características del gel y no son el resultado del crecimiento de coliformes o *E. coli*.
- El intervalo de lectura para la población total en las placas Petrifilm™ EC es de **15 a 150 colonias**.
- No cuente las colonias que aparecen en la barrera de hule espuma porque están fuera de la influencia selectiva del medio.
- Cualquier coloración azul (azulosa a rojo-azul) indica la presencia de *E. coli*.
- La luz frontal aumenta la detección del precipitado azul formado por cualquier colonia.
- El área de crecimiento circular es de aproximadamente 20 cm<sup>2</sup>.
- La estimación se puede hacer sobre placas conteniendo más de 150 colonias contando el número de colonias en uno o más cuadrados representativos y determinando el número promedio por cuadro. Multiplicar el número promedio por 20 para determinar el recuento estimado por placa.

#### 4.1. Interpretación de resultados para el conteo de hongos (placa YM)

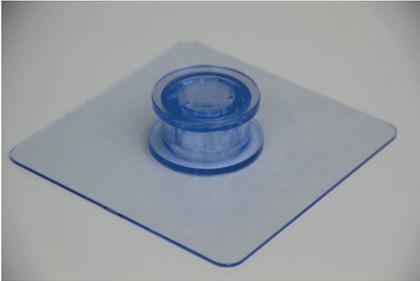
- Interpretar las placas de YM incubadas a  $25 \pm 1$  °C durante 3 días para realizar el conteo de levaduras y de 5 días para el conteo de mohos.
- Como cualquier otro método, se puede hacer una diferenciación con un examen microscópico. Las levaduras se distinguen fácilmente de los hongos.
- Las colonias de levaduras en la placa YM se observan con las siguientes características: colonias pequeñas, bordes definidos, presentan una coloración rosa/tostado a azul/verdoso, las colonias pueden aparecer elevadas (3D), generalmente no tienen un foco (centro negro) en el centro de la colonia.
- Las colonias de los hongos filamentosos son: grandes, tienen bordes difusos, de colores diversos (los mohos pueden producir sus propios pigmentos), las colonias son aterciopeladas, generalmente con un foco en el centro.
- La estimación del conteo se realiza al determinar el número medio de colonias en un cuadrado ( $1 \text{ cm}^2$ ) y multiplicar por 30 para obtener el recuento total por placa. El área inoculada de una placa Petrifilm™ Levaduras y Mohos es de aproximadamente  $30 \text{ cm}^2$ .

#### **NOTAS**

Las colonias de hongos filamentosos crecen entre las dos películas, la lectura de las placas Petrifilm™ no originará colonias adicionales a partir de nuevas esporas.

La incubación de las placas YM a una temperatura más alta no implica un resultado más rápido, sino que puede significar un resultado inexacto.

Las levaduras y mohos son organismos muy diversificados, y no siempre pueden ser distinguidos unos de otros macroscópicamente.



**Figura 12.1** Difusor 3M™ para cuenta aeróbica, coliformes y EC.



**Figura 12.2** Difusor 3M™ para mohos y levaduras.

## I. II Método de Compact Dry®

### **OBJETIVOS**

- Explicar el fundamento de la determinación de diversos grupos microbianos de importancia en alimentos, mediante el método de Compact Dry Plates®.
- Realizar adecuadamente la técnica de conteo microbiológico en placas de Compact Dry®.
- Interpretar adecuadamente los resultados de la cuenta en Compact Dry® y sus implicaciones en la calidad del alimento.

### **GENERALIDADES**

Compact Dry® es un procedimiento sencillo y seguro para la determinación y cuantificación de microorganismos presentes en productos alimenticios, cosméticos y otras materias primas, incluidas las farmacéuticas.

De manera general, las placas de Compact Dry® contienen nutrientes que permiten el crecimiento de diversos grupos microbianos específicamente, así como compuestos indicadores que revelan la presencia de dichos microorganismos. Las placas cuentan con indicadores redox, tal como el cloruro de 2,3,5-Trifenil

tetrazolio (TTC), compuestos cromogénicos, como el X-GAL, entre otros, que permiten la cuenta en placa de un determinado número de microorganismos presentes en una muestra, al desarrollarse como colonias en el medio de cultivo. Por lo tanto, mediante este método se determinan sólo las células microbianas viables en las condiciones que se trabaja (nutrientes, atmósfera y temperatura). Siendo que las colonias pueden originarse tanto de una célula como de un grupo de células, se utiliza el término: unidades formadoras de colonias (UFC).

## **FUNDAMENTO**

### **Compact Dry® TC para cuenta total**

La determinación de la cuenta total de microorganismos, en la placa Compact Dry® TC, se fundamenta en la capacidad de este grupo microbiano de desarrollarse en una placa que contiene los nutrientes del agar métodos estándar, además de un indicador redox rojo, cloruro de tetrazolio, el cual tiñe de color rosa/rojo las colonias que se desarrollan en la placa, después de incubarlas a una temperatura de  $35 \pm 2$  °C, durante 48 h.

### **Compact Dry® EC para *E. coli* y coliformes**

La determinación de los microorganismos coliformes se fundamenta en la capacidad de este grupo microbiano de hidrolizar el sustrato enzimático cromogénico Magenta-GAL debido a la actividad de su enzima beta-galactosidasa, por lo que las colonias de los coliformes son de color rojo/rosa, después de incubar las placas a una temperatura de  $35 \pm 2$  °C durante 24 h. En esta placa el crecimiento de otro tipo de bacterias se inhibe considerablemente y las que pudieran crecer no presentan coloración. Mientras que para la diferenciación de las colonias pertenecientes a *E. coli*, este microorganismo, al estar presente en la muestra, utilizará el sustrato cromogénico X-GLUC, que indica actividad de la enzima glucuronidasa, coloreándose las colonias de azul/púrpura.

### **Compact Dry® YM para el recuento de levaduras y mohos**

La determinación de las levaduras se fundamenta en la capacidad de este grupo microbiano de hidrolizar el sustrato enzimático cromogénico X-Phos, por lo que

las colonias de levaduras se desarrollan de color azul, mientras que la detección de los hongos filamentosos se fundamenta en la capacidad de poder desarrollarse en este medio de manera tridimensional, gracias a la cavidad de las placas Compact Dry®, con las características propias de cada género después de incubar la placas a una temperatura de 20 a 25 °C, durante 3 a 5 días para en conteo de levaduras y de 5 a 7 días para el conteo de hongos. En esta placa el crecimiento de otro tipo de bacterias se inhibe completamente por la presencia de antibióticos. Sumando las colonias de levaduras y mohos se obtiene el número total de hongos.

### **Compact Dry® SL para *Salmonella***

La técnica para la detección de *Salmonella* en alimentos por el método de Compact Dry® describe un esquema general que consiste de dos pasos básicos:

**Preenriquecimiento:** es el paso en donde la muestra es enriquecida en un medio nutritivo no selectivo, que permite restaurar las células de *Salmonella* dañadas, logrando de esta manera una condición fisiológica estable.

**Identificación en placa Compact Dry® SL:** este punto se deriva directamente del anterior y se utiliza la placa en la cual se restringe el crecimiento de otros géneros diferentes a *Salmonella* y permite el reconocimiento visual característico de colonias típicas de este microorganismo patógeno. Esta placa contiene un sustrato cromogénico que identifica a *Salmonella* spp. Este paso se fundamenta en tres pruebas: la primera es la capacidad de *Salmonella* de alcalinizar el medio, debido a que produce la enzima lisina descarboxilasa, lo que ocasiona un cambio de color en el medio de azul/púrpura a amarillo; la segunda prueba se basa en la utilización del sustrato enzimático cromogénico, por lo que las colonias de *Salmonella* se desarrollan de color verde o negras, las colonias negras son debido a la producción ácido sulfhídrico; la tercera prueba se refiere a la movilidad, que en el medio se observa por la aparición de un halo amarillo. Todas las pruebas se interpretan después de incubar la placa a una temperatura de 41 a 43 °C durante 24 h. En esta placa el crecimiento de otro tipo de bacterias se inhibe completamente por la presencia de Novobiocina.

### **MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES**

- 1 matraz Erlenmeyer de 250 mL de capacidad, con 90.0 mL de solución amortiguadora de fosfatos o agua peptonada al 0.1%, o con solución salina isotónica (SSI) al 0.85%.<sup>a</sup>
- 4 a 6 tubos de ensayo de 16 x 150 mm con tapón de rosca, conteniendo 9.0 mL de solución amortiguadora de fosfatos o agua peptonada al 0.1% o con solución salina isotónica (SSI), al 0.85%.<sup>a</sup>
- Placas de Compact Dry® TC.<sup>a</sup>
- Placas de Compact Dry® EC.<sup>a</sup>
- Placas de Compact Dry® YM.<sup>a</sup>

#### **(Para determinar *Salmonella* spp. en placa Compact Dry®)**

- 1 matraz Erlenmeyer de 500 mL de capacidad, conteniendo 225.0 mL de caldo lactosado.<sup>a</sup>
- 2 Placas de Compact Dry® SL.

### **MATERIAL Y EQUIPO**

- Balanza granataria.<sup>a</sup>
- Bolsas estériles para Stomacher® de calibre grueso con cierre o bolsas de cierre hermético de 25 x 35 cm.<sup>a</sup>
- Utensilios necesarios para la manipulación de muestras: cucharas, cuchillos, tenedores, todos estériles.<sup>a</sup>
- Pipetas graduadas de vidrio estériles de 1 mL, con algodón en el extremo superior (las necesarias de acuerdo con el número de diluciones) o micropipeta de 100 a 1000 µL con caja de puntas estériles.<sup>a</sup>
- Stomacher® (homogeneizador peristáltico) o motor de licuadora con vaso esterilizado.<sup>a</sup>
- Mecheros de Bunsen.<sup>a, b</sup>
- Portaobjetos.<sup>b</sup>
- Microscopio óptico.<sup>b</sup>

- Incubadora a 35 °C con termostato calibrado que evite variaciones mayores a  $\pm 0.1$  °C.<sup>a, b</sup>
- Incubadora de 41 a 43 °C con termostato calibrado que evite variaciones mayores a  $\pm 0.1$  °C.<sup>a</sup>

## **NOTAS**

<sup>a</sup> Material necesario al inicio de la práctica.

<sup>b</sup> Material necesario a las 24 h de iniciada la práctica.

## **PROCEDIMIENTO**

### **NOTA**

Una vez que se tiene la muestra o la dilución deseada, al igual que la placa Compact Dry® seleccionada (ver más adelante las diferentes placas de acuerdo con el grupo microbiano a determinar) se realizan los siguientes pasos:

- Distribuir las placas Compact Dry® sobre la mesa de trabajo, de acuerdo con el grupo microbiano a determinar, de manera que la inoculación se pueda realizar cómoda y libremente.
- Marcar las bases de las placas con la dilución y los datos pertinentes antes de inocular.
- Abrir la placa Compact Dry® en una zona aséptica y depositar 1.0 mL de la muestra o dilución, sobre la parte central del Compact Dry®, utilizando una pipeta estéril. Realizar por duplicado el análisis de cada dilución a evaluar.
- Colocar nuevamente la cubierta sobre la placa, girándola para cerrar.
- Emplear las siguientes condiciones de incubación para cada una de las diferentes placas:

**CUADRO 12.2** Condiciones de incubación para placas Compact Dry® de cuenta total, coliformes y hongos.

Tipo de placa	Temperatura y tiempo de incubación
Cuenta total TC	37 ± 2 °C por 48 h
Coliformes y <i>E. coli</i> EC	35 ± 2 °C por 24 h
Mohos y levaduras YM	20 a 25 °C durante 3 a 7 días

1. Registrar las características morfológicas tanto macroscópicas como microscópicas después del periodo de incubación; anotando la forma de la colonia, su color, color del medio circundante, morfología al Gram, entre otros.

### Compact Dry® SL para *Salmonella*

- **1ª etapa. Pre-incubación:** pesar asépticamente 25 g o mL de la muestra, en un recipiente estéril y diluir en 225 mL de diluyente.
- Homogenizar durante 1 min a velocidad media en el Stomacher®.
- Incubar la muestra a 35 ± 2 °C por 24 horas.
- **2ª etapa. Identificación:** Posterior al tiempo de pre-incubación, homogenizar la dilución y tomar 0.1 mL de alícuota (3 gotas), sembrar sobre uno de los costados del Compact Dry® SL (aprox. a 1 cm lejos del borde de la placa). La muestra difunde automáticamente. Una vez realizada la siembra de la muestra, adicionar como máximo 1 mL de diluyente (*buffer*) o agua estéril en el extremo opuesto de la placa; éste se difunde automáticamente sobre el resto de la superficie de la placa.
- Tapar herméticamente para evitar la pérdida de humedad y colocar la placa (tapa abajo) para incubar.
- Incubar a 41 ± 2 °C / 20-24 hrs.
- Realizar una tinción de Gram a las colonias sospechosas.
- Registrar las características morfológicas tanto macroscópicas como microscópicas; anotando la forma de la colonia, su color, el color del medio circundante, morfología al microscopio, Gram, entre otros.

## RESULTADOS

### Interpretación de resultados

#### 1. Compact Dry® TC para cuenta total

Las colonias que crecen son de color rojo, junto con las de otros colores, arrojan el recuento total. Calcular las UFC/mL empleando un cuenta colonias. Si las colonias son mayores a un valor de 250, contar las colonias presentes en 1 cm<sup>2</sup> de la placa y después multiplicar por 20.

#### 2. Compact Dry® EC para *E. coli* y coliformes

Los coliformes se observan como colonias color rojo o magenta, mientras que las colonias de *E. coli* se observan en color azul a púrpura.

#### 3. Compact Dry® YM para levaduras y mohos

Las levaduras se desarrollan en colonias puntiformes azules, mientras que los hongos desarrollados se muestran en forma radial de diferente pigmentación y tamaño, de acuerdo con el género del que se trate.

#### 4. Compact Dry® SL para *Salmonella*

- *Salmonella* positivo: la presencia de *Salmonella* spp. en estas placas debe mostrar las siguientes tres características: colonias de color verde claro a verde malaquita (negruzcas), cambio del medio de cultivo de morado a amarillo por la alcalinización del medio y motilidad de crecimiento, que se observa por la extensión del crecimiento en la prolongación de la superficie de la placa.
- *Salmonella* negativo: la presencia de otras bacterias del grupo coliforme como *E. coli* genera el cambio de color de azul/púrpura a rojo/púrpura por la fermentación de lactosa y/o sacarosa en el medio; este vire en el medio no deberá considerarse como positivo para *Salmonella*.

### Informe de resultados para las placas Compact Dry®

1. Para el caso de bacterias aerobias totales, contar el número de colonias desarrolladas en la placa, si el número de colonias se encuentra entre un intervalo de lectura de 25 a 250 colonias, multiplicar la cantidad de colonias por el inverso de la dilución (10, 100, 1000), y expresar el resultado como UFC/g o mL.

2. Sumando las colonias rojas y azules de la placa para coliformes y *E. coli*, resulta la cifra total del grupo coliforme, siempre que se encuentren en un intervalo de lectura de 15 a 150 colonias, y aplicando el inverso de la dilución correspondiente. Expresar el resultado como UFC de coliformes/g o mL.
3. En el caso de hongos, si el número de colonias se encuentra entre 10 a 150 colonias, multiplicar el número de colonias por el inverso de la dilución (10, 100, 1000) y expresar el resultado como UFC de mohos o levaduras/g o mL.  
Cuando esto no se cumple, se considera el resultado obtenido como VALOR ESTIMADO del recuento.
4. Para el caso de *Salmonella*, reportar presencia o ausencia de *Salmonella* spp. en 25.0 g o mL de alimento, o en la cantidad de muestra inicialmente pesada (si es mayor a 25.0 g o mL). Confirmar un resultado positivo por medio de ensayos bioquímicos o pruebas API.

## II. MÉTODOS ALTERNATIVOS DE IDENTIFICACIÓN

### II.1 API® 20E

#### **OBJETIVOS**

- Realizar adecuadamente la técnica de identificación bioquímica alternativa API® 20E.
- Interpretar adecuadamente los resultados de la identificación bioquímica API® 20E y sus implicaciones en la calidad del alimento.

#### **GENERALIDADES**

#### **SISTEMAS MINIATURIZADOS API®**

Los sistemas miniaturizados API® son métodos rápidos que permiten la identificación de microorganismos a través de la realización de diferentes pruebas bioquímicas. Estos sistemas consisten en un dispositivo plástico con varios microtubos que contienen diferentes medios de cultivo deshidratados o diferentes sustratos de enzimas, de acuerdo con el tipo de prueba que se requiere montar. Entre algunas de las pruebas bioquímicas que pueden realizarse con estos sistemas están las pruebas de fermentación de carbohidratos, determinación de la producción de H<sub>2</sub>S, la determinación de hidrólisis de la gelatina, entre otras.

En el mercado existe una variedad de galerías para ser utilizadas en la identificación de diferentes tipos de microorganismos, por ello, aunque todos estos sistemas tienen el mismo fundamento, difieren en el número y tipo de pruebas que permiten realizar, ya que su selección está directamente relacionada con la actividad metabólica del género al que pertenece el microorganismo a identificar. Entre algunos de los sistemas miniaturizados API® que actualmente se encuentran disponibles en el mercado tenemos:

#### **API® 20E**

Permite la identificación de microorganismos pertenecientes al grupo de las enterobacterias y de otros bacilos gram negativos. Es una galería conformada por 20 ensayos bioquímicos miniaturizados.

La presencia de enzimas y/o de productos metabólicos generados durante el periodo de incubación reaccionan con los sustratos contenidos en los microtubos y desarrollan en los mismos una coloración que puede aparecer en forma espon-tánea o con el agregado de algún reactivo para su revelado.

### **MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES**

- 1 tubo de fondo plano y tapón de rosca, con 5 mL de solución salina estéril al 0.85%.<sup>a</sup>

### **SOLUCIONES, REACTIVOS E INDICADORES**

- Colorantes para tinción de Gram.<sup>a</sup>
- Aceite mineral estéril.<sup>a</sup>
- Reactivo de oxidasa.<sup>a</sup>
- Hidróxido de potasio, KOH al 40%.<sup>b</sup>
- Solución de  $\alpha$ -naftol, al 5%.<sup>b</sup>
- Cloruro férrico, FeCl<sub>3</sub> al 10%.<sup>b</sup>
- Reactivo de Kovac.<sup>b</sup>

### **MATERIAL Y EQUIPO**

- Patrón de referencia equivalente al tubo 1 de McFarland o equipo DENSI-MAT.<sup>a</sup>
- Pipetas Pasteur estériles, tallo largo y bulbo.<sup>a</sup>
- Piseta con agua destilada.<sup>a</sup>
- Asa bacteriológica.<sup>a</sup>
- Mechero.<sup>a</sup>
- Microscopio óptico.<sup>a</sup>
- Portaobjetos.<sup>a</sup>
- Incubadora a 35 °C, con termostato que evite variaciones mayores de  $\pm 1.0$  °C, provista con termómetro calibrado.<sup>a</sup>

## NOTAS

<sup>a</sup> Material necesario al inicio de la práctica.

<sup>b</sup> Material necesario a las 24 y 48 horas de iniciada la práctica.

## PROCEDIMIENTO

Cada microtubo del sistema debe inocularse con una suspensión en solución salina al 0.85% de un cultivo puro del microorganismo a ser identificado. En algunos casos estos microtubos deben llenarse completamente con la suspensión, mientras que en otros se requiere del añadido de parafina líquida estéril o aceite mineral estéril, que proporciona las condiciones anaeróbicas necesarias.

- A partir de una colonia bien aislada del microorganismo, hacer una suspensión en un tubo estéril con 5 mL de solución salina (0.85% de NaCl) o 5 mL de agua estéril.
- Ajustar la suspensión a una turbidez equivalente al tubo 1 de McFarland.
- Llenar con la suspensión bacteriana hasta el nivel del tubo de todos los pocillos, mas no la cúpula (cada pocillo tiene un tubo y una cúpula, parte aerobia), deslizando la suspensión gota a gota, por la pared del tubo.
- Proseguir ahora con el llenado hasta la cúpula de los pocillos: CIT, VP, GEL con la suspensión bacteriana.
- Cubrir con parafina o aceite mineral estéril las cúpulas de los pocillos: ADH, LDC, ODC, URE, H<sub>2</sub>S, para obtener condiciones de anaerobiosis.
- Poner la tira en su propia cámara húmeda de incubación. Previamente a ello, llenar con agua los alvéolos de la cámara para proporcionar una atmósfera húmeda durante la incubación.
- Colocar la tapa y sellar por ambos lados. Identificar la prueba en una de las pestañas de la tapa. Incubar a  $35 \pm 2$  °C, durante 18-24 h.
- Las pruebas que requieren la adición de reactivos después del tiempo de incubación son: **TDA** (añadir una gota de FeCl<sub>3</sub> 10%), **VP** (añadir una gota del reactivo 1: KOH al 40% y una gota del reactivo 2: α-naftol al 5% (m/m)), **IND** (añadir una gota del reactivo de Kovac o de Dimetilamino-cinamaldehído), **Oxidasa** (añadir una gota del reactivo N-tetrametil-p-fenilendiamina, recién preparado).

## **INTERPRETACIÓN**

La interpretación de los resultados se basa en la observación de las coloraciones desarrolladas, ésta se lleva a cabo mediante la comparación del color obtenido en cada microtubo con el que muestra la carta de colores. De acuerdo con esa interpretación se puede establecer un resultado positivo (+) o negativo (-).

Después del periodo de incubación y de comparar con la carta de colores los resultados obtenidos en cada prueba bioquímica (**Tabla 12.1**), se colocan los datos en la hoja de resultados que suministra el fabricante (**Figura 12.3**).

Los datos obtenidos pueden transformarse en un código de 7 dígitos, denominado *perfil numérico* que resulta de la suma de los valores correspondientes a las pruebas positivas asignados previamente en la planilla. En algunos sistemas miniaturizados se recomienda la realización de pruebas bioquímicas opcionales, que permiten obtener dos dígitos adicionales.

El código obtenido corresponderá a un determinado género o especie de acuerdo con la información contenida en la base de datos suministrada por el fabricante y que puede encontrarse disponible en forma impresa y/o electrónica.

## **NOTAS**

Del conjunto de reacciones y resultados se obtiene un perfil numérico de 7 cifras. Los pocillos están separados en grupos de tres: en total tenemos 7 grupos de tres tubos o tripletes (el test número 21 corresponde al test de la oxidasa).

- Para obtener el perfil numérico de 7 cifras, a cada pocillo se le dará el valor 1, 2 o 4, de acuerdo con los siguientes criterios:
- Si la reacción es negativa se pone (-); si la reacción es positiva se pone (+).
- Al final, se suman los valores positivos de cada triplete, con las sumas de los siete tripletes se obtiene un código de 7 cifras.
- Con este código se busca en la tabla de identificación la especie de que se trata, para realizar esta operación hay programas informáticos.

**TABLA 12.1** Pruebas bioquímicas que contiene la galería API® 20E.

<b>Prueba</b>	<b>Reacción / Enzimas</b>	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>
<b>ONPG</b>	Beta-galactosidasa	sin color	amarillo
<b>ADH</b>	Arginina deshidrolasa	amarillo	rojo o naranja
<b>LDC</b>	Lisina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
<b>ODC</b>	Ornitina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
<b>CIT</b>	Utilización del citrato	verde	azul oscuro o turquesa
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Producción de H <sub>2</sub> S	sin precipitado negro	precipitado negro
<b>URE</b>	Ureasa	amarillo	rojo o naranja
<b>TDA</b>	Triptófano desaminasa	amarillo	marrón-rojo
<b>IND</b>	Producción de indol	amarillo	color rosa o anillo rosa-rojo
<b>VP</b>	Producción de acetoina (Voges-Proskauer)	sin color	rosa-rojo
<b>GEL</b>	Gelatinasa	sin difusión	difusión de pigmento
<b>GLU</b>	Fermentación/oxidación de glucosa	azul o verde	amarillo
<b>MAN</b>	Fermentación/oxidación de manitol	azul o verde	amarillo
<b>INO</b>	Fermentación/oxidación de inositol	azul o verde	amarillo
<b>SOR</b>	Fermentación/oxidación de sorbitol	azul o verde	amarillo
<b>RHA</b>	Fermentación/oxidación de ramnosa	azul o verde	amarillo
<b>SAC</b>	Fermentación/oxidación de sacarosa	azul o verde	amarillo
<b>MEL</b>	Fermentación/oxidación de melódiosa	azul o verde	amarillo
<b>AMY</b>	Fermentación/oxidación de amigdalina	azul o verde	amarillo
<b>ARA</b>	Fermentación/oxidación de arabinosa	azul o verde	amarillo
<b>OX</b>	Citocromo oxidasa	Sin color	Azul

The image shows a BIOMÉRIEUX API 20 E test strip result sheet. At the top left is the CE mark and the product name 'api® 20 E'. To the right is a 'REF.' field with a barcode-like structure. Below that is a field for 'Origine / Source / Herkunft / Origen / Origen / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie'. The main part of the sheet is a grid of 20 test wells, each with a number (1, 2, or 4) and a result (+ or -). Below the wells are the test names: ONPG, ADH, LDC, ODC, LCT, H<sub>2</sub>S, URE, TDA, IND, LVP, LGEL, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA, OX, NO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, MOB, McC, OF-0, OF-F. Below the grid are two boxes: 'Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy' and 'Ident. / Ταυτοποίηση:'. On the right side, there is vertical text: 'Imprimé en France / Printed in France'.

+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+			
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4			
ONPG	ADH	LDC	ODC	LCT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	LVP	LGEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	MOB	McC	OF-0	OF-F
7			1			3			4			0			5			4			5			7		

Figura 12.3 Hoja de resultados tira API® 20 E.

## II.II COLILERT®

### OBJETIVOS

- Realizar adecuadamente la técnica de identificación de *E. coli* por medio del sistema COLILERT®.
- Interpretar adecuadamente los resultados de la identificación de *E. coli* por medio del sistema COLILERT® y sus implicaciones en la calidad del alimento.

### GENERALIDADES

Colilert® detecta simultáneamente coliformes totales y *Escherichia coli*, en una muestra de agua en 24 horas o menos. Se basa en una tecnología de sustrato definido (DTS, por sus siglas en inglés, patentada por IDEXX. Cuando los coliformes totales hidrolizan el indicador ONPG (ortonitrofenil galactósido) presente en el medio del Colilert®, la muestra toma una coloración amarilla. Cuando *E. coli* metaboliza el indicador MUG (4-metilumbeliferil-β-D-glucurónido) de nutrientes de Colilert®, la muestra además fluoresce. Esta prueba puede detectar simultáneamente estas bacterias a una concentración de 1 UFC/100 mL de agua, dentro de 24 horas.

Al identificar *E. coli* específicamente, Colilert® elimina las notificaciones públicas innecesarias debidas a resultados falsos positivos inducidos por *Klebsiella pneumoniae*, suprime hasta 2 millones de heterótrofos por cada 100 mL. Así mismo, elimina la interpretación subjetiva de los métodos tradicionales. Detecta un coliforme o *E. coli* viable individual por muestra. Su facilidad de uso simplifica la capacitación, ya que consta de un empaque unidosis que elimina la preparación de medios de cultivo, no se necesita repetir la prueba debido a filtros ocluidos o a interferencia heterotrófica. El procedimiento de identificación puede completarse en 15 minutos.

Es aprobado por la Environmental Protection Agency (EPA) de Estados Unidos, AOAC, la International Bottled Water Association (IBWA), la European Bottled Watercooler Association (EBWA), entre otras organizaciones internacionales y aceptado por Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Métodos normales para el examen del agua y aguas residuales); también es aprobado en Canadá, Gran Bretaña, Japón, Argentina, Brasil, Chile, Colombia, México, Malasia, Nueva Zelanda, Taiwán, Irlanda, Islandia, Sudáfrica y aceptado para pruebas de cumplimiento en muchos otros países. Millones de pruebas efectuadas anualmente en todo el mundo y más del 90% de los laboratorios estatales de Estados Unidos utilizan Colilert®.

### **MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES**

- Kit de prueba Colilert®.<sup>a</sup>

### **MATERIAL Y EQUIPO**

- Frasco de vidrio estéril, con tapón de rosca y capacidad mínima de 100 mL.<sup>a</sup>
- Probeta de 100 mL, estéril.<sup>a</sup>
- Incubadora a 35 °C, con termostato que evite variaciones mayores de  $\pm 1.0$  °C, provista con termómetro calibrado.<sup>a</sup>
- Transiluminador de UV.<sup>b</sup>

### **NOTAS**

<sup>a</sup> Material necesario al inicio de la práctica.

<sup>b</sup> Material necesario a las 24 y 48 horas de iniciada la práctica.

### **PROCEDIMIENTO**

- Añadir el contenido de un paquete Colilert® a una muestra de 100 mL en un recipiente estéril transparente.
- Tapar y agitar bien el recipiente para homogenizar.
- Incubar a  $35 \pm 0.5$  °C, durante 24 h.

### **INTERPRETACIÓN**

Una vez cumplido el tiempo de incubación, leer los resultados:

- Menos amarillo que el original: negativo para coliformes totales y *E. coli*
- Amarillo y turbidez: positivo para coliformes totales
- Amarillo y fluorescencia: positivo para *E. coli*

## **II.III ENTEROLERT®**

### **OBJETIVOS**

- Explicar el fundamento de la determinación de enterococos totales en muestras de agua, mediante el método de Enterolert®.
- Realizar adecuadamente la determinación de enterococos totales en muestras de agua, mediante el método de Enterolert®.
- Interpretar adecuadamente los resultados de la identificación de enterococos totales por medio del sistema Enterolert® y sus implicaciones en la calidad del (agua) alimento.

### **GENERALIDADES**

En los últimos años los enterococos han recibido una creciente atención, ya que se ha observado un incremento notable de las infecciones en las que estos microorganismos se presentan como microbiota única. Los enterococos constituyen una fracción importante de la microbiota intestinal autóctona de los mamíferos y

otros animales. Una vez liberados al medio ambiente junto con las excretas, son capaces de colonizar diversos nichos ecológicos, sobre todo en los ambientes acuáticos, gracias a su capacidad para sobrevivir a las condiciones ambientales desfavorables y crecer en ambientes hostiles. Se ha detectado su presencia en materias primas empleadas para la elaboración de los alimentos (especialmente los de origen cárnico y lácteo). Así como en plantas de elaboración de alimentos y por contaminación cruzada durante los procesos de fabricación. Por todo ello, este grupo de bacterias, junto con las coliformes, han sido consideradas como indicadores del grado de higiene de los alimentos. Así mismo, los enterococos pueden contribuir a la diseminación de genes de resistencia fuera del ámbito hospitalario, lo que tiene una especial importancia en alimentos, sería posible su diseminación a la población en general, a través del uso con fines recreativos de aguas afectadas por efluentes cloacales crudos.

Los enterococos son células esféricas u ovoides, de tamaño  $0.6-2.0 \times 0.6-2.5 \mu\text{m}$ . Son cocos grampositivos, no formadores de endoesporas. Se presentan en forma de pares o de cadenas cortas. Son no móviles, con excepción de las especies *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*. Son anaerobios facultativos, quimiorganótrofos, con metabolismo fermentativo. Fermentan un amplio rango de carbohidratos con producción principalmente de ácido láctico, pero no de gas, y producen un pH final de 4.2-4.6. Presentan requerimientos nutricionales complejos. Son catalasa negativos o, más comúnmente, débilmente positivos. Crecen por lo general en un caldo de cultivo a  $10^\circ\text{C}$  y  $45^\circ\text{C}$ , aunque el crecimiento óptimo es a  $37^\circ\text{C}$ . Pueden crecer a pH 9.6, con 6.5% de NaCl y con 40% de bilis. Usualmente, fermentan la lactosa. Sobreviven después del calentamiento a  $60^\circ\text{C}$  durante 30 min.

La prueba Enterolert® detecta bacterias del género enterococos tales como *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*, *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, y *E. durans*. Que se encuentran principalmente en aguas recreativas y agua de mar.

## **FUNDAMENTO**

La determinación de microorganismos enterococos totales con el método de Enterolert®, se fundamenta en la capacidad de este grupo microbiano de producir la enzima  $\beta$ -glucosidasa, que hidroliza el sustrato fluorogénico 4-metil-umbeliferil  $\beta$ -D-glucósido a una temperatura de incubación de  $41.5^\circ\text{C}$ , durante 24 a 28 h. La determinación se interpreta como ausencia o presencia de enterococos, para lo cual se requiere la exposición del frasco de prueba a luz ultravioleta, cuando hay

la presencia de enterococos se desarrolla una fluorescencia azul, que indica una detección positiva. Con una sensibilidad de hasta 1 UFC/100 mL de muestra, se determina la presencia/ausencia de enterococos en 100 mL agua.

### **MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES**

- 2 kits de prueba Enterolert®, frasco de plástico y sobre con medio.<sup>a</sup>

### **MATERIAL Y EQUIPO**

- Incubadora a 41.5 °C, con termostato que evite variaciones mayores de  $\pm 1.0$  °C, provista con termómetro calibrado.<sup>a</sup>
- Transiluminador de UV.<sup>b</sup>

### **NOTAS**

<sup>a</sup> Material necesario al inicio de la práctica

<sup>b</sup> Material necesario a las 24 y 48 horas de iniciada la práctica

### **PROCEDIMIENTO**

- La toma de muestra se debe realizar de acuerdo con el procedimiento del protocolo de este libro.
- Colocar 100 mL de agua a analizar en el recipiente de plástico estéril transparente, no fluorescente.
- Añadir el contenido del kit.
- Tapar y agitar el recipiente hasta disolver completamente el polvo.
- Incubar a  $41 \pm 0.5$  °C durante 24 horas.
- Observar los resultados de acuerdo con la **Tabla 12.2**.

### **INTERPRETACIÓN**

Después de incubar los frascos, se observan en transiluminador y se determina si hay presencia de fluorescencia con luz ultravioleta de 6 vatios, 365 nm a unos 13 cm de la muestra, en un entorno oscuro.

Apuntar el haz de luz en dirección contraria a los ojos y hacia la muestra.

Si no hay fluorescencia significa que la muestra de agua no contiene enterococos, es decir, el resultado es negativo.

Si hay fluorescencia significa que la muestra de agua contiene enterococos, es decir, el resultado es positivo para enterococos.

Los resultados Enterolert-E son definitivos a las 24-28 h de incubación.

Considerar que un resultado positivo se puede observar antes de las 24 h y un resultado negativo se puede observar después de las 28 h y son válidos.

**TABLA 12.2** Interpretación de resultados para prueba Enterolert®.

Apariencia	Resultado
Ausencia de fluorescencia	Negativo para enterococos
Fluorescencia azul	Positivo para enterococos

## NOTAS

Cuando se utiliza el kit de Enterolert®, debe considerarse lo siguiente:

- El muestreo debe realizarse de acuerdo con el apartado respectivo para evitar el aumento en la cantidad de microorganismo.
- Almacenar entre 2-30 °C, alejado de la luz.
- Para comparación, se puede utilizar blanco testigo de agua al interpretar los resultados.
- Enterolert-E es una prueba primordialmente para agua.
- Las características de rendimiento de Enterolert-E no se aplican a muestras alteradas por cualquier enriquecimiento o concentración previos.
- Siempre debe aplicarse una técnica aséptica cuando se utilice Enterolert-E.
- El contenido de los frascos una vez interpretados se deben desechar en cumplimiento con las buenas prácticas de laboratorio. En este caso, se mandan a esterilizar o, posteriormente, se desechar en el dispositivo para incinerar.
- Las pruebas de control de calidad interna de IDEXX se realizan según ISO 11133:2014. Los certificados de control de calidad se encuentran disponibles en [idexx.es/water](http://idexx.es/water).

## **EXPRESIÓN DE RESULTADOS**

Reporta la presencia o ausencia de enterococos totales en 100 mL de agua analizada.

## **II.IV E\*Colite**

### **OBJETIVOS**

- Realizar adecuadamente la técnica de identificación de *E. coli* por medio del sistema E\*Colite.
- Interpretar adecuadamente los resultados de la identificación de *E. coli* por medio del sistema E\*Colite y sus implicaciones en la calidad del alimento.

### **GENERALIDADES**

Las bolsas y frascos Charm E\*Colite se usan en muestras de agua, comida, y jugos para la detección de coliformes y *Escherichia coli*. La US Environmental Protection Agency (EPA) aprueba la “bolsa” test dando resultados positivos o negativos en 28 horas para coliformes y de 28 a 48 horas para *E. coli*. El sistema E\*Colite permite la detección tanto de un coliforme, como de *E. coli* en 100 mL de muestra. Las muestras de alimentos como la leche o el jugo se deben de diluir en solución salina para la prueba. La prueba E\*Colite contiene un medio selectivo rico en carbohidratos útil para detectar y restaurar los coliformes que estuvieron bajo un tratamiento de cloración, o que pudieran estar presentes en bebidas, botellas y aguas saborizadas. El sistema también funciona como un contenedor de muestra, no se requieren de envases estériles o pastillas de tiosulfato de sodio ya que la bolsa E\*Colite contiene una pastilla de tiosulfato integrada. El sistema E\*Colite es estable a temperatura ambiente por 12 meses.

Los resultados son visuales al examinar el color. Una prueba negativa es amarilla, la presencia de coliformes es fácil de ver debido a un cambio de color a azul. Y azul con fluorescencia indica la presencia de *E. coli*.

## **FUNDAMENTO**

Se basa en la determinación de presencia o ausencia de microorganismos coliformes y *Escherichia coli*, encontrados en muestras de agua clorada, embotellada y otras bebidas, permitiendo la recuperación de células dañadas, debido a que contiene nutrientes necesarios para su regeneración y un indicador X-GAL que produce un azul índigo ante una reacción positiva con este sustrato.

La sensibilidad de la prueba permite detectar un microorganismo coliforme en 100 mL de agua y ha sido correlacionada en un 98% con los métodos de referencia LTB/BGLB al detectar 4 log de microorganismos coliformes.

El sistema E\*Colite utiliza detergentes específicos para minimizar las interferencias debidas a la microbiota acompañante y está provisto de un dispositivo bactericida que, después de la prueba, logra una reducción del orden de 7 a 8 log de microorganismos.

## **MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES**

- Sistema E\*Colite.<sup>a</sup>

## **MATERIAL Y EQUIPO**

- Probeta de 100 mL, estéril.<sup>a</sup>
- Incubadora a 41.5 °C, con termostato que evite variaciones mayores de  $\pm 1.0$  °C, provista con termómetro calibrado.<sup>a</sup>
- Transiluminador de UV.<sup>b</sup>

## **NOTAS**

<sup>a</sup> Material necesario al inicio de la práctica.

<sup>b</sup> Material necesario a las 24 y 48 horas de iniciada la práctica.

## **PROCEDIMIENTO**

- Abrir el frasco o bolsa del sistema E\*Colite en zona aséptica.
- Añadir 100 mL de muestra, hasta cubrir la zona punteada marcada en el contenedor

- Cerrar la bolsa formando dos dobleces y asegurando con los laterales metálicos, formando un nudo o apretando la rosca en el caso del sistema de frasco.
- Ejercer presión hacia abajo sobre la muestra líquida y romper la primera división de la bolsa para mezclar con el medio deshidratado y la pastilla de tiosulfato (en el caso de la bolsa); para el caso del frasco basta con homogenizar.
- Incubar a  $35 \pm 2$  °C durante 28 horas.

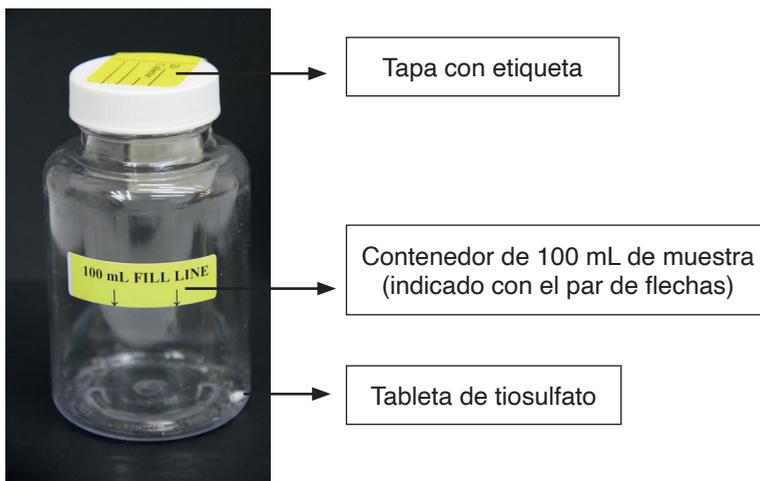
### **INTERPRETACIÓN**

Después de las primeras 28 h de incubación, interpretar:

- Medio permanece amarillo: negativo para coliformes
- Medio vira a azul índigo: positivo para coliformes totales
- Medio azul y fluorescente: presencia de *E. coli*

### **NOTA**

Si después de las primeras 28 h no hubo un cambio en el medio, incube 20 h más (total 48 h) y repita la interpretación de resultados.



**Figura 12.4** Frasco empleado para la identificación de *E. Coli*.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- BIOMÉRIEUX API® 20E Sistema de Identificación de *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram negativos no exigentes. Recuperado el 7 de septiembre de 2016 de [www.biomerieux.com](http://www.biomerieux.com) bioMérieux, Inc. Francia.
- COLILERT. Prueba fácil de 24 horas, para coliformes y *E. coli* Recuperado el 7 de septiembre de 2016 de [www.idexx.com](http://www.idexx.com). Guía de interpretación rápida.
- Compact Dry. Simple and Effective System for Colony Counting. Recuperado el 7 de septiembre de 2014 de [www.hardydiagnostic.com](http://www.hardydiagnostic.com) Hardy diagnostic.
- Compact dry producto. Recuperado el 7 de septiembre de 2016 de <http://www.hyserve.com/produkt.php?lang=es&gr=1&pr=13>
- Compact Dry “Nissui” X-SA for Staphylococcus aureus. Users Manual. Recuperado el 7 de septiembre de 2016 de [http://www.nissui-pharm.co.jp/english/industry/pdf/CompactDry\\_XSA\\_E.pdf](http://www.nissui-pharm.co.jp/english/industry/pdf/CompactDry_XSA_E.pdf)
- Compact Dry™ LS. Recuperado el 7 de septiembre de 2016 de [https://catalog.hardydiagnostics.com/cp\\_prod/Content/hugo/CompactDryLS.html](https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/CompactDryLS.html) y de <http://hardydiagnostics.com/compactdry.html>
- Compact Dry™ X-SA. Recuperado el 7 de septiembre de 2016 de [https://catalog.hardydiagnostics.com/cp\\_prod/Content/hugo/CompactDryXSA.html](https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/CompactDryXSA.html)
- Análisis de Detección de Microorganismos. Biotecnologías de agua Ltda  
Recuperado el 7 de septiembre de 2016 de [http://www.biohidrica.cl/ensayo\\_compactdry.htm](http://www.biohidrica.cl/ensayo_compactdry.htm)
- Compact Dry SL (for Salmonella) 40/240/920 plates Id No. 1002973/1002938/1002940 for Salmonella detection Simple and Easy Dry Medium for Microbial Detection Compact Dry PI\_SL-version 06-08-920pcs.pdf. Recuperado el 7 de septiembre de 2016 de [http://www.hyserve.com/files/Compact%20Dry%20PI\\_SL-version%2006-08-920pcs.pdf](http://www.hyserve.com/files/Compact%20Dry%20PI_SL-version%2006-08-920pcs.pdf)
- Charm Sciences INC. E\*Colite: test for total Coliforms and *E. coli* in Potable Water. Recuperado el 7 de septiembre de 2016 de [www.charm.com](http://www.charm.com)
- 3M™ Petrifilm™ Placas para el recuento de aerobios, Guía de interpretación rápida. Recuperado el 7 de septiembre de 2016 de [www.3m.com/microbiology](http://www.3m.com/microbiology).

3M™Petrifilm™ *Placas para el recuento de coliformes totales, Guía de interpretación rápida.* Recuperado el 7 de septiembre de 2016 de [www.3m.com/microbiology](http://www.3m.com/microbiology).

3M™Petrifilm™ *Placas para el recuento de E. coli, Guía de interpretación rápida.* Recuperado el 7 de septiembre de 2016 de [www.3m.com/microbiology](http://www.3m.com/microbiology).

3M™Petrifilm™ *Placas para el recuento de mohos y levaduras, Guía de interpretación rápida.* Recuperado el 7 de septiembre de 2016 de [www.3m.com/microbiology](http://www.3m.com/microbiology).

3M™Petrifilm™ *Recomendaciones y uso de las placas.* Recuperado el 7 de septiembre de 2016 de [www.3m.com/microbiology](http://www.3m.com/microbiology).



# 13

## Identificación bacteriana con el sistema VITEK® 2 bioMérieux

---

### **OBJETIVOS**

- Describir el sistema semiautomatizado VITEK® 2 para la identificación de diversos tipos de bacterias de importancia en alimentos.
- Utilizar adecuadamente el sistema VITEK® 2 para la identificación de bacterias de importancia en alimentos.
- Interpretar adecuadamente los resultados de la identificación VITEK® 2 y sus implicaciones en la calidad del alimento.

### **GENERALIDADES**

La contaminación microbiana es uno de los principales problemas de peligro potencial que se asocia con enfermedades transmitidas por alimentos durante su consumo, de manera que han surgido nuevas necesidades en el análisis microbiológico de los mismos. Las toxiinfecciones alimentarias conllevan a un elevado impacto económico durante el complejo análisis y búsqueda de los microorganismos patógenos presentes; las alteraciones organolépticas que puedan sufrir los alimentos por una mala manipulación e higiene son factores que también preocupan a la industria alimentaria, lo que implica la realización de un gran número de pruebas que proporcionen resultados rápidos y confiables. Debido a lo anterior y como parte del sistema de análisis de riesgo y puntos críticos de control (HAACP, por sus siglas en inglés), en la industria de alimentos se ha implementado el uso de métodos rápidos que permitan la toma de decisiones en poco tiempo y la aplicación temprana de medidas correctivas. En la mayoría de los casos suponen, además de un ahorro de material y horas de trabajo, ser muy útiles cuando se analizan un gran número de muestras.

En este sentido, el sistema VITEK® permite la identificación rápida de microorganismos de manera automatizada, es decir, está provisto de un equipo automático que realiza el pipeteo y la dilución para el llenado de las pruebas de identificación microbiana y sensibilidad a antibióticos, proporcionando resultados en un periodo de aproximadamente 18 horas.

### VITEK® bioMérieux

El equipo opera con tarjetas especiales, tanto para una identificación bacteriana (**ID**) como para evaluar la sensibilidad a antibióticos (**AST**). Para el caso de identificación microbiana, cuenta con un sistema óptico de transmitancia que realiza la lectura de color a diferentes longitudes de onda, debido a reacciones metabólicas producidas por los microorganismos sobre sustratos específicos y una turbidimétrica para la susceptibilidad a los antibióticos.

Las tarjetas de identificación microbiana contienen 64 pruebas, cada una de ellas con un sustrato especial, permitiendo la identificación de diferentes grupos microbianos y una mayor discriminación entre especies. Se encuentran disponibles los siguientes tipos de tarjetas:

- **GN:** para bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores.
- **GP:** para cocos y bacilos Gram positivos no formadores de esporas.
- **YST:** para levaduras y organismos similares más significativos.
- **BCL:** para bacilos Gram positivos formadores de endoesporas.
- **ANC:** para bacterias anaerobias corinebacterias.
- **NH:** para *Neisseria-Haemophilus* y organismos exigentes más significativos, desde el punto de vista clínico.

Estas tarjetas miden diferentes respuestas según las reacciones dadas por la actividad metabólica del microorganismo con el sustrato, como acidificación, alcalinización, hidrólisis enzimática sobre sustratos cromogénicos y crecimiento en presencia de sustancias inhibitoras.

Las tarjetas se encuentran protegidas por ambos lados con una película que favorece la apropiada transferencia de oxígeno, a la vez impide o previene el contacto con la suspensión microbiana durante su manipulación. Cada tarjeta se asocia a un tubo de plástico con la suspensión microbiana para permitir la inoculación e hidratación de todos los sustratos o antibióticos por capilaridad. En

la parte superior de la misma posee un código de barras que provee al sistema la siguiente información: tipo de tarjeta (ID o AST), número de lote, fecha de expiración y un identificador único que impide la reutilización de la tarjeta una vez que ha entrado en el equipo para su análisis.

Las tarjetas se incuban por un periodo máximo de 18 horas a una temperatura de 35 °C, durante este tiempo el sistema VITEK® 2 toma lecturas cada 15 min de cada prueba, mide la producción de coloración debido al metabolismo de los sustratos, o bien, la turbidez debido al crecimiento o inhibición del microorganismo por los antibióticos.

Para realizar un análisis de identificación microbiana con el sistema VITEK® 2, es necesario que los cultivos cumplan con las características que se listan en el **Cuadro 13.1**. Estas características se refieren al medio de cultivo para propagar el microorganismo, tiempo de incubación y densidad requerida de la suspensión microbiana, de acuerdo con el grupo microbiano al que pertenece el cultivo a identificar y por lo tanto a la tarjeta. También se menciona el tiempo aproximado del análisis.

Una vez que el equipo analiza las tarjetas, se recurre a la base de datos del sistema VITEK® 2 para asignar la identificación. La base de datos se construye con un gran número de cepas de microorganismos previamente caracterizados, identificados y probados bajo diferentes condiciones de cultivo. Estas cepas provienen de colecciones de fuentes clínicas, industriales, del ATCC, así como de colecciones de cultivos universitarios.

**CUADRO 13.1** Características de los cultivos microbianos para el análisis de identificación en el sistema VITEK® 2.

Tipo de tarjeta	Medio de cultivo	Tiempo de incubación	Rango en escala de McFarland	Resultado en apróx.
<b>GN; AST-GN</b>	TSA, TSAB, CBA, MAC, CHOC, HEK, SM ID, VRBG, XLD	18 a 24 h	0.50 - 0.63	10 horas o menos
<b>GP; AST-GP</b>	TSAB, TSA, BP, CBA, CHOC, MSA, SAID	12 a 48 h		8 horas o menos
<b>YST; AST-YS</b>	SDA, TSAB, CBA, TSA, CID	18 a 72 h	1.80 - 2.20	18 horas
<b>BCL</b>	TSA	18 a 24 h		14 horas
<b>NH</b>	<u>Campylobacter</u> : TSAB, CBA, CHBA <u>Haemophilus</u> : CHOC, CBA, CHOC + B <u>Neisseria</u> : CHOC, TM, TSAB	<u>Campylobacter</u> : 18 a 24 horas  Organismo exigente: 18 a 24 horas	2.70 - 3.30	6 horas
<b>ANC</b>	<u>Corinebacterias</u> : CBA, CNA, TSAB_  <u>Anaerobios</u> : CBA, BRU, TSAB  <u>Anaerobios gram-positivos</u> : CNA, PEA	Corinebacteria: 18 a 24 h  <u>Anaerobios</u> : 18 a 72 h		6 horas

**TSA** = agar de soya tripticasa; **TSAB** = agar de soya tripticasa con sangre de carnero; **BRU** = agar *Brucella* con sangre de carnero al 5%, hemina y vitamina K; **CBA** = agar Columbia con sangre de carnero al 5%; **CNA** = Agar Columbia con sangre de carnero al 5%; **CHOC** = agar chocolate; **CHOC + B** = agar chocolate con Bacitracina; **HEK** = agar Hektoen; **MAC** = agar MacConkey; **SM ID** = ChromID *Salmonella* (agar ID2 SM); **SAID** = ChromID *S. aureus* (*S. aureus* ID agar); **CID** = ChromID *Candida* (agar ID2 *Candida*); **VRBG** = agar con cristal violeta, rojo neutro, bilis y glucosa; **XLD** = desoxicolato xilosa lisina; **BP** = Baird Parker; **MSA** = agar sal manitol; **SDA** = agar sabouraud dextrosa; **TM** = agar Thayer-Martin; **PEA** = agar de alcohol feniletílico con sangre de carnero al 5%.

### **MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES**

- Cultivo puro del microorganismo a identificar propagado en el agar adecuado (ver **Cuadro 13.1**).<sup>a</sup>
- Solución salina al 0.45% estéril.<sup>b</sup>

### **MATERIAL Y EQUIPO**

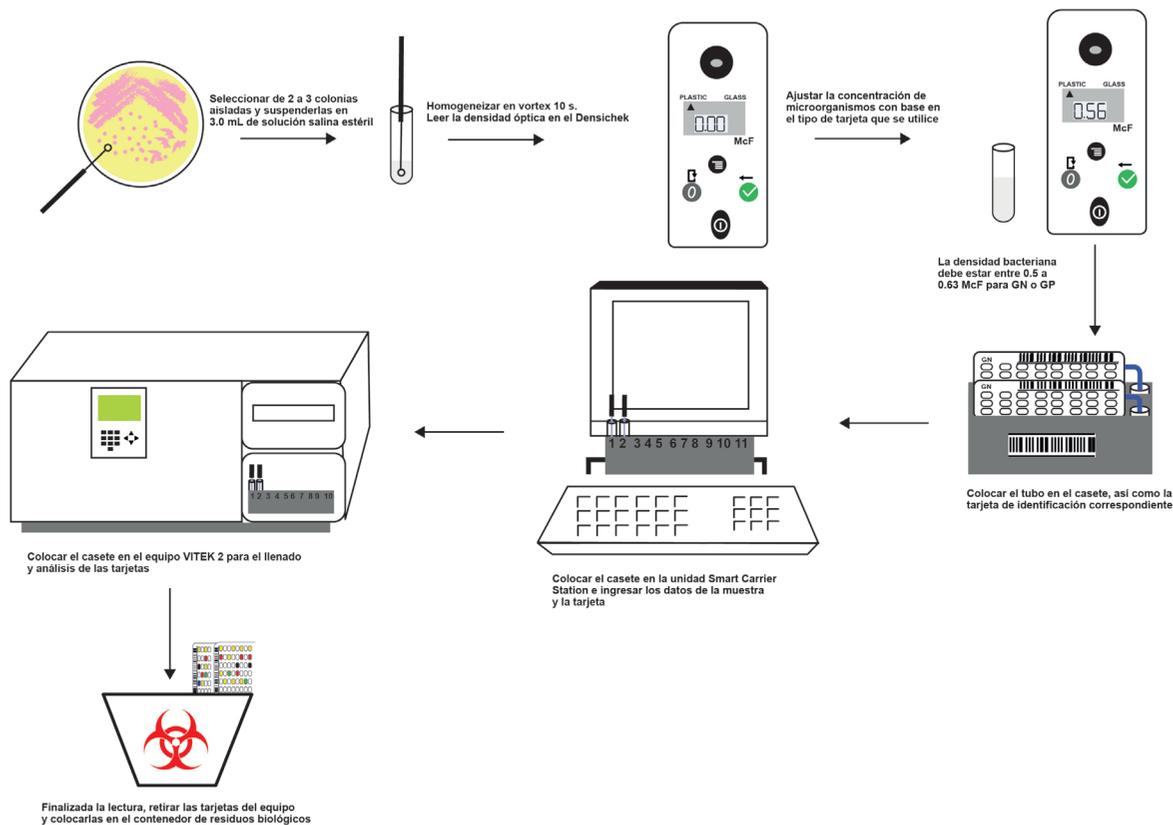
- Asa bacteriológica.<sup>b</sup>
- Calibradores del DensiCHEK™.<sup>b</sup>
- Casete porta tubos VITEK® 2.<sup>b</sup>
- Computadora *Smart Carrier Station* (SCS).<sup>b</sup>
- Dispensador de solución salina de volumen ajustable.<sup>b</sup>
- Mechero.<sup>b</sup>
- Papel parafilm.<sup>b</sup>
- Tarjeta(s) ID o AST VITEK® 2.<sup>b</sup>
- Tubos de ensayo desechables de poliestireno de 12 x 75 mm.<sup>b</sup>
- Unidad VITEK® 2 DensiCHEK™.<sup>b</sup>
- Vortex.<sup>b</sup>

### **NOTAS**

<sup>a</sup> Material necesario 24 horas antes de iniciar la práctica.

<sup>b</sup> Material necesario al inicio de la práctica.

## MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS PARA EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS



**Figura 13.1** Diagrama para la identificación bacteriana utilizando el sistema VITEK® 2 de bioMérieux.

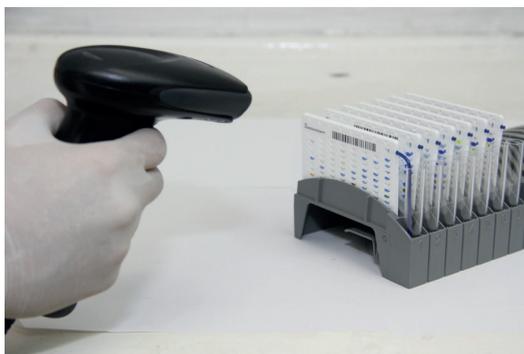
## PROCEDIMIENTO

### 1. Preparación de la suspensión microbiana (inóculo)

- Transferir asépticamente 3.0 mL de solución salina estéril al 0.45%, en un tubo de ensayo de poliestireno de 12 x 75 mm.
- Seleccionar el cultivo puro a identificar, tomar con el asa bacteriológica estéril las colonias aisladas y resuspender en la solución salina del punto anterior, cubrir con papel parafilm.
- Homogenizar la suspensión en el vortex, alrededor de 10 segundos.
- Medir la densidad de la suspensión con la unidad DensiCHEK™ de bloque óptico, previamente calibrado.
- Girar lentamente el tubo de ensayo, en 360° antes de mostrarse la lectura y medir una densidad de McFarland equivalente al rango necesario según el **Cuadro 13.1**.
- Colocar el tubo con el inóculo ya estandarizado en el casete.

### 2. Registro de datos y selección de la tarjeta

- Colocar el casete en el *Smart Carrier Station* (SCS) para encender la pantalla.
- Oprimir ENTER (↵) hasta ubicarse en la pantalla en el recuadro que dice: **“No. de examen”**, para ingresar un identificador o nombre.
- Ubicar el recuadro **“Tipo de tarjeta”** y leer con el escáner el código de barras de la tarjeta para que se ingrese el número en automático (**Figura 13.2**).



**Figura 13.2** Casete VITEK® 2 con capacidad para registrar 15 muestras.

- Para registrar más tarjetas, desplazarse a la siguiente posición, apretando la flecha derecha de la siguiente tecla:



y seguir los pasos anteriores. Pueden registrarse hasta 15 muestras en un solo casete.

- Retirar el casete del *Smart Carrier Station* una vez finalizado el registro.
- Introducir el casete en el equipo VITEK® encendido previamente.
- El llenado y sellado de las tarjetas es automático. La incubadora tiene capacidad para incubar hasta 60 tarjetas al mismo tiempo. Todos los tipos de tarjetas se incuban en línea a  $35 \pm 1.0$  °C.

## **INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

Una vez transcurrido el periodo del análisis, el equipo reporta los resultados de la prueba. Como parte del proceso de identificación, el *software* compara el conjunto de reacciones de la prueba con el conjunto de reacciones previstas de los grupos microbianos y de cada microorganismo para que pueda identificarse con el resultado de cada prueba. El sistema calcula un valor cuantitativo (el porcentaje de probabilidad) cuando se da una coincidencia perfecta entre el patrón de reacción de la prueba y el patrón único de reacción de un sólo microorganismo o grupo de microorganismos, proporcionando una probabilidad del 99%. Así mismo, varios niveles cualitativos de identificación se asignan con base en el cálculo de probabilidad numérica. Los diferentes niveles y la información asociada se muestran en el **Cuadro 13.2**.

**CUADRO 13.2** Niveles de identificación.

<b>Nivel de concordancia en la identificación</b>	<b>Microorganismos posibles asociados</b>	<b>% de probabilidad</b>	<b>Comentarios</b>
Excelente	1	96 a 99	
Muy bueno	1	93 a 95	
Bueno	1	89 a 92	
Aceptable	1	85 a 88	
Débil discriminación	2 a 3	Suma de opciones = 100; después de resolver a una opción, el porcentaje de probabilidad refleja el número asociado con la opción elegida	De 2 a 3 taxones muestran el mismo perfil bioquímico. Separe mediante pruebas complementarias
Organismo no identificado	>3  ó  0	n/c	Cualquiera de los >3 taxones muestra el mismo perfil bioquímico ó Perfil bioquímico muy atípico. No corresponde a ningún taxón de la base de datos. Verifique la cepa mediante una tinción de Gram y su pureza.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- bioMérieux, Inc. (2011). User manual\_v. 410791\_VITEK 2 Systems Product Information. Recuperado el 15 de octubre de 2016 de <http://techlib.biomerieux.com>
- Koneman E., Washington W. Jr., Janda W., Stephen A., Procop G., Schrenberger P. & Woods G. (2006). *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 6<sup>th</sup> Edition. Lippincott Williams & Wilkins. pp. 292-293.
- Pincus D. (2009). *Microbial identification using the bioMérieux VITEK 2 System*, Editor bioMérieux Hazewood, USA.

# 14

## Evaluación de higiene en superficies vivas o inertes

---

### **OBJETIVOS**

- Cuantificar microorganismos viables en superficies vivas o inertes, con o sin tratamientos de sanitización.
- Aplicar métodos de enumeración adecuados, según la superficie a analizar.
- Relacionar la estimación de la cifra de microorganismos presentes en la superficie analizada, con la condición higiénica y con las posibles implicaciones para la salud del consumidor y para la estabilidad del alimento.
- Explicar el efecto de sustancias desinfectantes utilizadas en los procesos de higiene de superficies.
- Comparar la efectividad de diferentes sustancias desinfectantes utilizadas en los procesos de higiene de superficies.

### **GENERALIDADES**

#### **ANÁLISIS DE SUPERFICIES**

Se lleva a cabo para verificar la efectividad de los PES o POES. En el análisis pueden determinarse microorganismos indicadores y/o microorganismos específicos, según las necesidades. Para ello se utilizan los medios de cultivo y recuento oficiales.

Siguiendo las instrucciones de los POES, del método de recuento y contando con un valor normativo, es posible decidir sobre el nivel de contaminación que prevalece sobre una superficie.

**Actualmente no hay especificaciones vigentes al respecto en México; la mayoría de las empresas y consultorías utilizan las de la Norma Oficial Mexicana**

**NOM-093-SSA1-1994 “Prácticas de Higiene y Sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos”, aunque está derogada, ya que la norma vigente (NOM-251-SSA1- “Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios”) no establece especificaciones.**

**TABLA 15.1** Límites recomendados para superficies en contacto con alimentos (NOM-093-SSA1-1994).

Prueba	Límite permitido (UFC/cm <sup>2</sup> )	
	Superficies inertes	Superficies vivas
Mesofílicos aerobios	< 400	< 3000
Coliformes totales	< 200	< 10

Otra especificación de referencia internacionalmente aceptada es la de USDA, que establece un límite de  $\leq 5$  UFC/cm<sup>2</sup> para superficies en contacto con alimentos, antes de iniciar el proceso y después de sanitizar.

Como se mencionó, las determinaciones se llevan a cabo por los métodos oficiales. Lo que sí varía mucho son las formas de muestreo en las superficies. A continuación se describen los más importantes:

## **HIGIENE EN LA PLANTA DE ALIMENTOS. ANÁLISIS DE SUPERFICIES Y DE AMBIENTE**

Se sabe bien que cada año ocurren miles de casos de infecciones e intoxicaciones transmitidas por los alimentos y que una proporción considerable tiene un desenlace fatal. Estos problemas de salud causan también pérdidas económicas por ausentismo e incremento en el costo de los servicios de atención médica. Todo esto sucede debido a que, a pesar de los esfuerzos desarrollados por las autoridades, productores y otros participantes, todavía hay volúmenes considerables de productos alimenticios que llegan contaminados al consumidor, a causa de un manejo deficiente.

De ahí la importancia de eliminar o controlar, en forma efectiva, los microorganismos presentes en materias primas, ingredientes, utensilios, equipo, superficies de trabajo y en todo aquello con lo que los alimentos entren en contacto. La

presencia de números elevados de bacterias en los alimentos o en el equipo y utensilios relacionados indica que se manipularon de manera deficiente.

En los buenos resultados de higiene y sanidad de los alimentos, el equipo tiene mucha importancia, como también la tienen los operarios que manejan el equipo y los que preparan y sirven alimentos; estas actividades implican una gran responsabilidad para la salud de los consumidores y para los objetivos de salud pública de un país.

La inocuidad de los alimentos es producto de muchas acciones directas e indirectas, dentro de las cuales el manejo higiénico y el monitoreo de ésta, a través del muestreo y análisis de superficies vivas e inertes y del ambiente, son de gran importancia.

La tendencia actual en la industria alimentaria es implementar planes y programas de análisis de riesgos y puntos críticos de control (HACCP, por sus siglas en inglés). HACCP es un programa moderno con enfoque preventivo, cuyo objetivo fundamental es eliminar de los alimentos los riesgos para la salud, asociados al consumo de los mismos. En este programa, como en cualquier otro orientado a garantizar inocuidad, son requisitos indispensables: la capacitación del personal en buenas prácticas de manufactura, los programas de limpieza e higiene, los procedimientos estandarizados de sanitización y el establecimiento de un sistema de monitoreo para asegurarse de que se están siguiendo las instrucciones para eliminar los riesgos.

Por eso es de suma importancia el conocer metodologías adecuadas para el análisis de superficies vivas o inertes y del ambiente. De esa manera, con base en los resultados analíticos, es posible conocer las condiciones de operación reales que prevalecen en la industria. El análisis de estos resultados permitirá identificar niveles de higiene e implementar medidas correctivas oportunas, cuya finalidad es la obtención de alimentos dentro de estándares de calidad y seguridad alimentaria.

A continuación se presenta el significado de algunos términos en el tema del manejo higiénico de los alimentos:

- a. **Contaminación:** es la presencia de cualquier material extraño en los productos alimenticios, que origina sean inadecuados para el consumo.
- b. **Contaminación cruzada:** proceso por el cual los microorganismos son trasladados de una zona sucia o contaminada a una zona limpia, por medio de personas, equipos, materiales o ambiente.

- c. **Control de calidad:** procedimiento planificado y sistemático de acciones para que, a lo largo de la producción, almacenamiento y distribución, se asegure la protección del consumidor y garanticen los atributos esperados en los alimentos, de acuerdo con la legislación aplicable y normatividad propia de las empresas.
- d. **Higiene:** parte de la Medicina que tiene como propósito la conservación de la salud y los medios para prever las enfermedades; limpieza es la primer regla de la higiene.
- e. **Higiene de los alimentos:** todas las medidas necesarias para garantizar la inocuidad de los alimentos en cada una de las fases, desde su producción primaria, almacenamiento, transporte, transformación industrial, distribución, hasta consumo final.
- f. **Higiénico:** libre de niveles nocivos de microorganismos y contaminantes.
- g. **Limpio:** libre de suciedad visible.
- h. **Sanitización:** aunque no es una palabra reconocida por la Real Academia Española (RAE), proviene del inglés *sanitation* y se utiliza en la industria para describir un proceso que incluye lavar e higienizar, es decir, lavar y mantener libre de contaminantes y microorganismos en niveles nocivos.

También se define sanitización como la reducción de microorganismos en superficies, hasta niveles que se consideran seguros para los estándares de salud pública. El centro de control de enfermedades (Control Disease Center, CDC por sus siglas en inglés, 2016), considera que la sanitización debe reducir 5 ciclos logarítmicos de un microorganismo específico; el criterio aplica especialmente en la evaluación de sanitizantes. Como los microorganismos pueden encontrarse hasta en billones, la reducción del 99.999% (5 ciclos logarítmicos) aún permite la supervivencia de algunos miles de microorganismos, pero eso es “un nivel aceptable para salud pública”.

Esta reducción difícilmente es posible si hay residuos de materia orgánica (de alimentos, por ejemplo). Por eso la sanitización implica lavar primero y después aplicar un tratamiento (químico o físico) de reducción de carga microbiana. Finalmente, hay que resaltar que la sanitización no debe afectar de ninguna manera al producto, su inocuidad, ni implicar riesgos para los consumidores (cabe señalar que *saneamiento* tiene un significado diferente; es un término que generalmente se asocia a ecología y se refiere al conjunto de

obras, técnicas y dispositivos encaminados a establecer, mejorar o mantener las condiciones sanitarias de un ambiente).

- i. **Sanidad:** significa sano y, en alimentos, consiste en la condición de conservar la calidad de los productos mediante métodos físicos (frío, calor) o químicos (sal, ácidos, conservadores, etc.), manteniendo sus propiedades nutrimentales.

Existen procesos de lavado y desinfección que utilizan sustancias y condiciones de tratamiento propios para cada necesidad, en las distintas ramas de la industria de alimentos. Éstos se denominan *Procedimientos Estandarizados de Sanitización* (PES) o *Procedimientos de Operación Estandarizados para la Sanitización* (POES) y son una descripción detallada de cada etapa que debe llevarse a cabo para garantizar que la sanitización sea correcta. Por supuesto, deben estar por escrito, ser bien conocidos y operados por el personal responsable, debe documentarse su aplicación en cada evento y deben tener adecuada supervisión. Cuando las normas o recomendaciones para su aplicación se siguen con acierto, los resultados son claramente satisfactorios.

## MÉTODO DEL HISOPO

Esta técnica se puede utilizar en superficies que sean regulares, lisas, pulidas. Consiste en frotar un aplicador de madera u otro material con algodón (hisopo) estéril, humedecido con la solución diluyente que recogerá la flora microbiana en un área determinada, generalmente 100 cm<sup>2</sup> o una pieza (tenedor, vaso), para finalmente suspenderla en el diluyente. A partir de esa dilución original se hace el análisis deseado; en los recuentos se aplica el factor de dilución.

## Muestreo

Colocar la plantilla estéril o delimitar un área aproximada de 10.0 x 10.0 cm sobre la superficie que se va a muestrear. Sacar el hisopo asépticamente. Si la superficie está seca, humedecer el hisopo en la solución diluyente y presionar contra la pared del frasco o tubo con un movimiento de rotación para quitar el exceso de líquido; en caso contrario, no es necesario hacer esto.

Con el hisopo inclinado, frotar la superficie delimitada por la plantilla con 10 trazos en sentido horizontal y 10 en sentido vertical. Introducir el hisopo al tubo o frasco

lentamente y quebrarlo en la parte del hisopo superior, para no introducir al tubo la parte del hisopo que estuvo en contacto con los dedos. A partir de aquí, realizar los análisis como siempre.

Cuando se buscan patógenos, se sustituye la solución diluyente por el caldo de cultivo (enriquecimiento o preenriquecimiento) adecuado.

### **Muestreo de utensilios de comedor**

Para este muestreo deben utilizarse guantes estériles para sujetar el utensilio en estudio. Tomar un hisopo estéril, mojarlo en la solución diluyente y exprimir el exceso de líquido sobre la pared del tubo. Pasar el hisopo sobre la superficie del utensilio, especialmente las zonas que están en contacto con el alimento o con la boca. Como en el caso anterior, regresar el hisopo al tubo y romper la parte que estuvo en contacto con los dedos.

Se pueden usar cantidades mayores o menores de diluyente, en función de la carga microbiana esperada. A partir de aquí, realizar los análisis como siempre.

### **Muestreo de superficies vivas**

En este caso, frotar el hisopo, girándolo, por toda la mano del operador, incluyendo palma, dorso, cara interna y externa de cada dedo y uñas. El hisopo se regresa al tubo de diluyente, eliminando la parte que sujetó el analista que tomó la muestra.

## **MÉTODO DE LA ESPONJA**

Esta técnica se puede aplicar para tomar muestras de superficies grandes. Se utilizan esponjas estériles de espuma de poliuretano, generalmente de 13.0 x 7.5 x 4.0 cm (o de las dimensiones requeridas), que se esterilizan dentro de bolsas de plástico transparentes. Las esponjas comerciales ya vienen en las bolsas y se esterilizan con óxido de etileno. Si no se cuenta con ellas, se pueden esterilizar por separado y utilizar bolsas de Stomacher®.

El método consiste en pasar la esponja sobre toda la superficie del equipo o utensilio que se va a muestrear, luego se recupera la carga microbiana de la superficie de la esponja, con el diluyente y se analiza éste para estimar el contenido microbiano de una amplia superficie, no únicamente de dimensiones limitadas.

Es un método especialmente adecuado para muestrear superficies vivas, ya que fácilmente se frota la palma de la mano y las partes interna y externa de cada dedo.

## **Muestreo**

La bolsa de plástico abre y se invierte a modo de guante sobre la mano del muestreador, haciendo que la parte interna pase a ser la externa; con la mano así protegida, se toma una esponja retirándola de la envoltura de papel manila.

Se humedece la esponja con un poco de diluyente estéril y se frota completamente toda la superficie que se va a muestrear. Terminando el muestreo, se regresa la bolsa a su posición original, quedando la esponja en su interior. Luego se adiciona el resto del diluyente y se cierra la bolsa. Para suspender la carga microbiana en el diluyente, se exprime repetidamente la esponja. A partir de esta suspensión, se llevan a cabo los análisis.

Las superficies y utensilios a muestrear pueden ser de forma y tamaño muy diverso tales como: mesas, tablas de picar (tratando de llegar a las hendiduras y esquinas), utensilios de comedor (tomar muestra de la superficie del utensilio con excepción del mango, prestando atención a la parte interna, como es el caso de los tenedores entre diente y diente), vasos, platos (tomar la superficie expuesta a los alimentos, incluyendo el borde que está en contacto con los labios del usuario). A partir de esta suspensión, se llevan a cabo los análisis.

Para muestrear las manos, el muestreador debe usar guantes estériles y frotar la esponja por toda la mano, abarcando palma, dorso, cara interna y externa de cada dedo y uñas. Después, la esponja se introduce al diluyente, se exprime repetidas veces y a partir de esta suspensión, se llevan a cabo los análisis.

## **MÉTODO DE ENJUAGUE TOTAL**

Se emplea para tomar muestras de objetos pequeños como cucharas, tenedores, biberones, etc., o para el muestreo de superficies interiores de envases, botellas, bolsas de plástico, entre otros. Se requiere únicamente el diluyente estéril, en cantidad suficiente y, según el objeto a muestrear, una bolsa de Stomacher® estéril, o bien, un vaso de precipitados u otro recipiente para el enjuague o un embudo estéril.

### **Muestreo de utensilios**

Sumergir la superficie de los utensilios que estén en contacto con la boca (cucharas, tenedores) en un frasco de boca ancha con la solución diluyente; o verter la solución dentro de la bolsa estéril, introducir el objeto que se va a muestrear, enjuagar perfectamente bien el objeto y regresar el diluyente al frasco inicial. A partir de aquí se realizan los análisis.

### **Muestreo de superficies interiores**

Introducir, en el envase a muestrear, 10.0 mL de diluyente; puede usarse otro volumen adecuado, según el tamaño del recipiente y la contaminación que se espere. Enjuagar haciendo correr el líquido por toda la superficie interna, agitando bien. Regresar el contenido de los envases al frasco, usando el embudo estéril, si es necesario. A partir de aquí se realizan los análisis.

## **ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS**

Cualquiera que haya sido el método de muestreo, continuar el análisis de forma tradicional.

## **MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES**

Medios de cultivo para la determinación de microorganismos indicadores; para preparar de 4 a 8 placas de cada uno, según la contaminación esperada.

## ***EQUIPO Y MATERIAL***

- Mechero.
- Pipetas automáticas de 1.0 mL.
- Incubadoras a diferentes temperaturas.
- Cuenta colonias.

## **PROCEDIMIENTO**

- Transferir volúmenes de 1.0 mL y 0.1 mL de la suspensión, a cajas de Petri marcadas con la clave, fecha, medio de cultivo y dilución inoculada.
- Agregar el medio de cultivo adecuado para la determinación e incubar en las condiciones ideales:
  - Agar triptona extracto de levadura para cuenta de mesófilos aerobios; incubar a  $35 \pm 1$  °C / 24 a 48 h.
  - Agar bilis rojo violeta para cuenta de organismos coliformes totales; añadir una doble capa del medio, una vez que solidifique. Incubar a  $35 \pm 1$  °C / 24 a 48 h.
  - Agar papa dextrosa acidificado para cuenta de hongos y levaduras, acidificado a pH de  $3.5 \pm 0.1$  con ácido tartárico estéril al 10% (aproximadamente 1.4 mL de ácido tartárico por cada 100 mL del medio). Incubar a  $28 \pm 1$  °C / de 5 a 7 días.

## **RESULTADOS DE SUPERFICIES**

Contar todas las colonias que se desarrollen en las cajas, hacer el cálculo de las colonias por mL, multiplicar por el volumen de diluyente empleado y dividirlo entre los cm<sup>2</sup> de la superficie. Cuando se muestrean 100 cm<sup>2</sup> y se suspende la muestra en 10 mL de diluyente, los cálculos son muy fáciles, pues cada mL de la suspensión corresponde a 10 cm<sup>2</sup>.

Los resultados se expresan en UFC/cm<sup>2</sup>.

### **Ejemplo**

Si se tomó la muestra de 25 cm<sup>2</sup> y se suspendió en 10 mL de diluyente, multiplicar el número de colonias x 10 y dividir el resultado entre 25 para obtener UFC/cm<sup>2</sup>.

## **RESULTADOS DE UTENSILIOS DE COMEDOR**

Hacer el cálculo del número de colonias por mL, multiplicar por el volumen total de diluyente y reportar UFC/utensilio.

## **RESULTADOS DE UTENSILIOS DE SUPERFICIES VIVAS**

Cuando la superficie muestreada fueron las manos de un operador de la cadena de producción de alimentos, el número de colonias /mL obtenido se multiplica por el volumen de diluyente y se informan UFC/mano. En caso de haber muestreado ambas manos, dividir entre 2 e informar UFC/mano.

## **MÉTODOS ALTERNATIVOS**

Hasta aquí se han visto métodos de muestreo que requieren de un diluyente en el cual se suspende la carga microbiana proveniente de la superficie en estudio; a partir de dicha suspensión, se efectúan los análisis microbiológicos. Hay un método en el cual se muestrea directamente con el medio de cultivo, mediante una impronta de la superficie en éste. Es el método RODAC.

### **MÉTODO DE PLACA POR CONTACTO, RODAC (Replicate Organism Detection and Counting)**

Las placas RODAC están disponibles comercialmente; son medios de cultivo sólidos tradicionales, con una superficie que sobresale del borde del recipiente que la contiene; puede ser plana o convexa. La placa se impronta sobre el área a muestrear, como si se estuviera sellando.

Como se conoce el área de la placa, el recuento da directamente UFC/área o se establecen escalas como la de American Public Health Association (APHA), ver **Tabla 15.2**, para superficies planas, impermeables:

**TABLA 15.2** Interpretación de placas RODAC.

<b>Mesófilos aerobios (UFC/placa)</b>	<b>Interpretación</b>
0-5	Excelente
6-15	Bueno
16-30	Máximo aceptable ( <i>borderline</i> )
31-50	Riesgo. Repetir sanitización
>50	Inaceptable

Fuente: PACUC, 2013

También puede ser que alguna empresa establezca sus propios límites, con base en su experiencia y particularidades.

Este método se recomienda para obtener datos cuantitativos en superficies planas e impermeables. Idealmente, la placa se debe utilizar sobre superficies sanitizadas y/o desinfectadas, ya que en superficies con un alto grado de contaminación, se obtiene crecimiento masivo en las placas y se hace imposible el recuento. Es necesario agregar al medio de cultivo un agente neutralizante, que elimine los residuos de sanitizantes o desinfectantes de la superficie; por ejemplo, lecitina para neutralizar compuestos cuaternarios de amonio y polisorbato 80 para neutralizar desinfectantes fenólicos.

Cuando se muestrean varias superficies sanitizadas, se recomienda incluir una placa con muestra de superficie no sanitizada, como referencia.

### **Muestreo**

Quitar la tapa de plástico de la placa RODAC y presionar cuidadosamente el agar contra la superficie, como sellando. No conviene tallar el agar sobre la superficie, pues la dispersión de muestra hará difícil el conteo.

Tapar la placa e incubar en posición invertida 24-48 h a  $35 \pm 1$  °C.

### **BIBLIOGRAFÍA**

*Manual of Food Quality Control. 12. Quality assurance in the food control microbiological laboratory.* FAO, Rome, 1997.

*Manual de prácticas. Curso: Toma y manejo de muestras para análisis bacteriológico.* Laboratorio Nacional de Salud Pública. México, 1992.

*Standard methods for the examination of dairy products.* 18th ed. APHA, 2012. Secretaría de Salud. *Procedimiento para el examen microbiológico de superficies y utensilios.* Laboratorio Nacional de Salud Pública. México, 2007.



# 15

## Evaluación de higiene por métodos rápidos

---

### OBJETIVOS

- Aplicar la detección de ATP por bioluminiscencia para evaluar la higiene de una superficie.
- Conocer el fundamento del sistema *3M™ Clean Trace™* para la evaluación de higiene.
- Identificar las ventajas y desventajas del sistema *3M™ Clean Trace™*.
- Comparar el método sistema *3M™ Clean Trace™* con otros métodos tradicionales para la evaluación de la higiene.

### GENERALIDADES

Uno de los factores principales para asegurar la inocuidad de los alimentos es la higiene del equipo y superficies que están en contacto con los productos, en las plantas industriales. Por ello, se han desarrollado métodos rápidos para evaluar la higiene del equipo antes de iniciar la producción de cada lote en la industria alimentaria.

Un grupo de estos métodos rápidos se basa en la determinación de ATP residual de microorganismos o alimentos, mediante la reacción de bioluminiscencia que ocurre en las luciérnagas:



El método consiste en tomar una muestra de la superficie en evaluación mediante un hisopo. A continuación, el hisopo se coloca en el recipiente de fábrica y se “activa” la reacción, rompiendo la membrana que separaba el hisopo nuevo de los reactivos (extractante, luciferina y magnesio). Al ponerse en contacto el

ATP con los reactivos, se genera luz que puede medirse en el aparato, en este caso, el *3M™ Clean Trace™*. También se pueden usar esponjas para muestrear la superficie y, en ese caso, se emplea un hisopo para líquidos, que absorbe una cantidad determinada del líquido exprimido de la esponja y luego se activa del mismo modo. Este hisopo para líquidos también puede usarse para muestrear directamente el agua del último enjuague.

En todos los sistemas basados en esta reacción, la luz emitida por la muestra se mide mediante escalas arbitrarias que se estandarizan para que el usuario pueda tomar decisiones en cada industria particular, a partir de los resultados.

El proceso de evaluación de higiene se ha estandarizado prácticamente en todos los equipos para muestrear áreas de 100 cm<sup>2</sup> (10x10 cm) con un hisopado de 10 trazos en un sentido y otros 10 trazos en sentido perpendicular.

En el sistema *3M™ Clean Trace™*, la emisión de luz se registra en unidades relativas de luz (RLU, por sus siglas en inglés) y se establecen los siguientes límites generales de aceptación/rechazo:

- Las superficies se consideran limpias si la lectura es <150 RLU
- Se interpreta como precaución de 150 a 299 RLU
- Se considera no-aceptable un resultado > 300 RLU (3M, 2005)

## **MATERIAL Y EQUIPO**

- Dos tablas para picar.
- Dos mesas del laboratorio.
- 10 plantillas de opalina o cartulina de 12x12 cm, con recuadro interno de 10x10 cm, **previamente esterilizadas.**
- 10 hisopos de *3M™* (pueden ser de superficie o para líquidos) *Clean Trace™*.
- 2 manojos de cilantro.
- 2 cuchillos con buen filo previamente esterilizados.
- Detergente lavatrastes.
- 4 esponjas.
- Desinfectante de uso en alimentos y recipiente para prepararlo.
- Luminómetro *3M™ UNI-LITE™*.

**NOTA**

El material descrito es el que se empleará de forma global por grupo. El profesor indicará la organización de superficies a analizar.

**PROCEDIMIENTO****Diseño general del experimento**

Dado que contamos con un número limitado de hisopos, se sugieren las siguientes pruebas, por duplicado y llevando a cabo una prueba cada equipo. Conviene hacerlas en orden para que todos vean cada resultado.

**1. Preparación de las superficies previo al muestreo con hisopos de superficie 3M™ CleanTrace™ en mesa de laboratorio.**

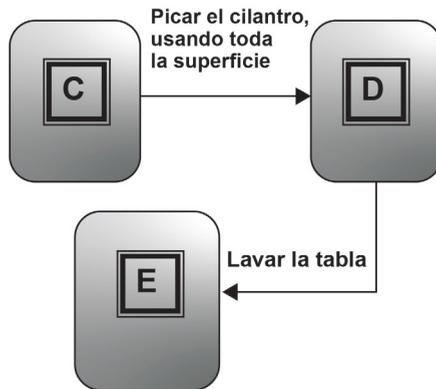
Para realizar el ensayo analizando la superficie de la mesa de laboratorio, colocar las plantillas elaboradas en las dimensiones especificadas, de acuerdo con la **Figura 16.1**.



**Figura 16.1** Colocación de las plantillas en la mesa de laboratorio:  
A) Mesa del laboratorio sin lavar. B) Mesa de laboratorio lavada.

**2. Preparación de las superficies con hisopos de superficie 3M™ CleanTrace™ en tabla de picado o preparación de alimentos.**

Para realizar el ensayo analizando la superficie de una tabla de picado o preparación de alimentos, colocar las plantillas elaboradas en las dimensiones especificadas de acuerdo con la **Figura 16.2**. El muestreo de la tabla después de picar el cilantro se hace únicamente con fines didácticos, ya que en la práctica no se hace la evaluación en una superficie que tiene residuos o suciedad visibles.



**Figura 16.2** Colocación de las plantillas en la tabla para picar o preparar alimentos y procedimiento para realizar el ensayo: **C)** Tabla previa a la preparación o picado del alimento. **D)** Tabla después de preparar o picar el alimento. **E)** Tabla lavada después de la preparación o picado del alimento.

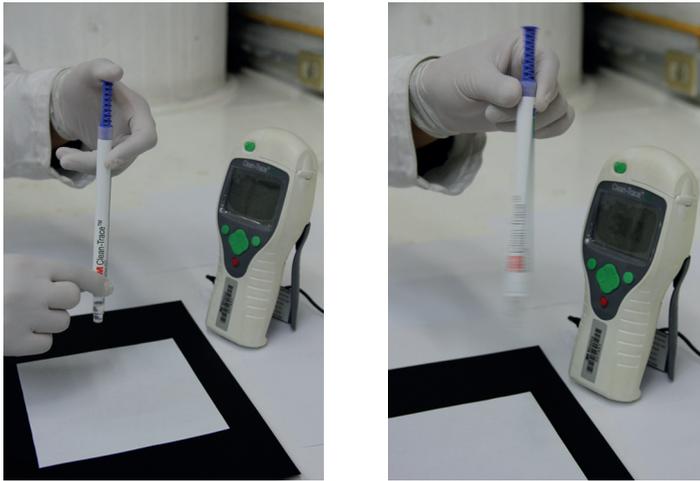
### 3. Muestreo

- Encender el Luminómetro y dejar que lleve a cabo su autocalibración; el aparato indica cuándo está listo.
- Colocar la plantilla en la superficie a muestrear, abrir el hisopo y tomar la muestra mediante 10 trazos verticales y 10 horizontales en el espacio libre dentro de la plantilla, como muestra la **Figura 16.3**.



**Figura 16.3** Muestreo de la plantilla colocada sobre la superficie de análisis con el hisopo de 3M™ CleanTrace™.

- Introducir el hisopo a su estuche, cerrar y presionar hacia abajo para liberar la solución de reactivos de la reacción de bioluminiscencia; agitar lateralmente 5 veces. La muestra es estable hasta 30 min antes de activarla; una vez activado el hisopo, debe hacerse la lectura antes de 1 min (**Figura 16.4**).



**Figura 16.4** Introducción del hisopo *3M™ CleanTrace™* a estuche y mezclado con reactivos.

- Introducir el hisopo al Luminómetro, cerrar la tapa, presionar el botón de lectura y registrar el dato. El equipo puede almacenar una gran cantidad de lecturas cuando se ha diseñado un plan de muestreo y pueden descargarse a una PC. (**Figura 16.5**).



**Figura 16.5** Introducción y lectura del hisopo 3M™ CleanTrace™ al Luminómetro.

- Una vez registrados todos los datos, interprete los resultados utilizando la escala de la página 256 y comenten los resultados.

#### **4. Para hisopos de líquidos**

La diferencia radica en que este tipo de hisopos, en vez de un recubrimiento fibroso en el extremo, para recoger los residuos en la superficie muestreada, tiene un diseño especial para que al sumergirlos en líquido, se llenen exactamente con 500 µL.

En este caso, se harán las siguientes determinaciones:

- A.** Enjuagar la mesa de trabajo sin lavar
- B.** Enjuague de la mesa de trabajo después de lavar
- C.** Enjuague de una tabla o utensilio sin lavar
- D.** Enjuague del piso
- E.** Enjuague de la tapa del bote de basura

Usualmente se aplican al agua de enjuague del equipo, especialmente el que se sanitiza con método CIP (*cleaning in place*). Cuando se analizan superficies, es necesario recolectar el agua de enjuague en un recipiente limpio, por ejemplo un

vaso de precipitado, o bien, muestrear con esponja estéril o torunda de algodón impregnada en agua estéril; se exprimen en un vaso limpio y luego se sumerge el hisopo en el líquido durante 3 ó 4 segundos.

Se regresa el hisopo a su estuche, se activa, se agita lateralmente 5 veces y se toma la lectura.

Otros objetos que se pueden muestrear con fines didácticos (no se acostumbra hacerlo en la industria) son: el piso, teléfonos celulares, manijas de puertas antes y después de limpiarlos con toallitas desinfectantes, etc.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Felman P. (2000). Bioluminiscencia. Empresa Axonas. Recuperado el 14 de octubre de 2016 de <http://www.axonas.com.ar/index.php/bioluminiscencia/>

Hansen D., Hilgenhoer M., Poop W. (2007). ATP bioluminescence –for kitchen hygiene and Cleaning control of surgical instruments. International Journal of Infection Control. University Hospital, Essen, Germany. Recuperado el 25 de septiembre de 2016 de <http://www.ijic.info/article/viewPDFInterstitial/3036/2220>.

3M Microbiology (2008). Technical Bulletin. An overview of Rapid Hygiene Testing Using ATP Bioluminescence. EUA.

3M (2005). *Manual técnico del sistema de evaluación de higiene Biotrace*. UK.



# 16

## Monitoreo del ambiente

### OBJETIVO

Evaluar la calidad microbiológica del aire, mediante el método de sedimentación en placas (o placas expuestas).

### GENERALIDADES

La importancia del aire como reservorio de microorganismos es enorme; en ambientes microbiológicamente controlados, es necesario monitorear regularmente la contaminación microbiana en el aire, para detectar cambios en los patrones de ésta y, sobre todo, para identificar situaciones de riesgo. El muestreo puede hacerse de manera pasiva, sólo permitiendo la sedimentación de las partículas del aire, en medios de cultivo adecuados. O puede hacerse por métodos activos, que incluyen burbujear volúmenes conocidos de aire, en un diluyente estéril, o varios dispositivos especiales.

En México, no hay normatividad al respecto. Sin embargo, llevar a cabo el monitoreo del aire es importante, por lo que las empresas fijan sus estándares, en función de su propia experiencia, riesgos y necesidades. Como referencia, se pueden usar los límites establecidos por *Standard Methods for the examination of Dairy Products*, aunque cabe señalar que se basan en métodos activos (de ahí que las especificaciones sean por m<sup>3</sup>):

**TABLA 17.1** Límite de microorganismos permitidos en ambiente.

Prueba	Límite permitido
Mesofílicos aerobios	≤ 15 UFC/m <sup>3</sup>
Coliformes totales	0 UFC/ m <sup>3</sup>
Hongos y levaduras	≤ 15 UFC/m <sup>3</sup> (para la sumatoria de ambos cómputos)

Fuente: Marshall, 1992.

Entre los métodos pasivos, el esquema 1/1/1 es el más utilizado; consiste en contar las UFC desarrolladas en una caja de Petri de 9 cm de diámetro, provenientes de la sedimentación durante 1 hora, colocando las placas a 1 m de altura desde el piso y a 1 m de distancia paredes y obstáculos mayores. El resultado se denomina índice de contaminación microbiana del aire (*index of microbial air contamination*; IMA, por sus siglas en inglés). Es el más sencillo y el que llevaremos a cabo.

### **MEDIOS DE CULTIVO, SOLUCIONES Y REACTIVOS**

- 1 placa de agar cuenta estándar.
- 1 placa de agar bilis y rojo violeta.
- 1 placa de agar papa y dextrosa.

### **EQUIPO Y MATERIAL**

- Incubadora a diferentes temperaturas.
- Microscopio.
- Cuenta colonias.

### **PROCEDIMIENTO**

1. Marcar adecuadamente las placas con los medios de cultivo.
2. En el sitio de interés, destapar las cajas a 1 m del suelo y a 1 m de paredes y obstáculos. Colocar la tapa junto a la caja, boca abajo.
3. Colocar cerca las diferentes placas, para obtener información lo más completa posible, de la zona de muestreo.
4. Dejar las cajas expuestas durante 1 hora. Taparlas.
5. Incubar las placas invertidas, según corresponda al medio de cultivo.
6. Al término del periodo de incubación, contar UFC; de acuerdo con el método, usando el esquema 1/1/1, se reportan directamente UFC/m<sup>3</sup>/h.
7. Opcional: después de registrar características de desarrollo y morfología colonial, hacer un frotis (ver al mismo tiempo consistencia de colonia, color, bordes, elevación, tamaño). Teñir con Gram y, cuando sea necesario, con otro colorante. Observar al microscopio.

## **INFORME DE RESULTADOS**

Registre el número de UFC/caja y reporte directamente IMA: \_\_\_\_ UFC/m<sup>3</sup>/h.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- CDC (2008). Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities. Center for Disease Control and Prevention. Recuperado el 24 de septiembre de 2016 de:  
[http://www.cdc.gov/hicpac/Disinfection\\_Sterilization/19\\_00glossary.html](http://www.cdc.gov/hicpac/Disinfection_Sterilization/19_00glossary.html)
- Marshall R.T. (1992). *Standard methods for the examination of Dairy Products*. American Public Health Association. Washington, D. C.
- MRO Q&A (2010). What are the differences between sanitizing, disinfecting and sterilization? Series maintenance, repair and operational issues in food plants. *Food Processing*. Recuperado el 23 de septiembre de 2016 de:  
[www.foodprocessing.com/articles/2010/007/](http://www.foodprocessing.com/articles/2010/007/).
- Napoli C., Marcotrigiano V. & Montagna M.T. (2002). Air sampling procedures to evaluate microbial contamination: a comparison between active and passive methods in operating theatres. *BMC Public Health*. 12: 594. doi:  
[10.1186/1471-2458-12-594](https://doi.org/10.1186/1471-2458-12-594)
- Norma Mexicana NMX-F.605-NORMEX-2000. Alimentos Manejo Higiénico en el Servicio de Alimentos Preparados para la Obtención del Distintivo H.
- PACUC (2013). PACUC Guideline Microbiological Monitoring (RODAC Plates). Purdue Animal Care and Use Comitte, Purdue University. USA.
- Pascual M.R. & Calderón V. (2000). *Microbiología Alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas*. 2<sup>a</sup>. Ed. Díaz de Santos. Madrid, España.
- Secretaría de Salud (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Prácticas de Higiene y Sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. México.
- Secretaría de Salud (2009). Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009. Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios, México.



# 17

## Identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

---

### OBJETIVOS

- Conocer y comprender el fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos.
- Realizar la identificación fenotípica y molecular de bacterias patógenas.
- Identificar las ventajas y limitaciones de los métodos moleculares sobre los métodos tradicionales.
- Comprender y explicar la función de cada uno de los componentes de la PCR.
- Interpretar los resultados obtenidos y asociarlos con la bacteria identificación de la bacteria patógena.
- Aplicar los conocimientos aprendidos para la selección de genes que puedan ser empleados para la identificación de bacterias patógenas.
- Identificar los puntos críticos del proceso.
- Asociar la reacción en cadena de la polimerasa con la detección y cuantificación de diversos microorganismos en alimentos.
- Realizar una comparación de este método molecular con el procedimiento de identificación tradicional para *Listeria monocytogenes*.

### GENERALIDADES

La seguridad microbiana y la calidad de los alimentos está determinada por el tipo y número de microorganismos que se encuentran en él, ya que pueden causar deterioro o, después de la ingestión, enfermedad en los consumidores por infección o intoxicación.

El principal objetivo de la Microbiología de alimentos es emplear métodos adecuados para detectar, enumerar e identificar microorganismos en alimentos. El conteo de células viables puede ser realizado tomando una muestra del alimento, llevándolo a una suspensión homogénea e inoculando en medios líquidos o sólidos para obtener un conteo de colonias o el número más probable de células.

La identificación consiste en el uso específico de medios selectivos y diferenciales, en el caso de patógenos sospechosos, generalmente es seguido de la identificación de la especie y la tipificación de la cepa. Estos métodos de cultivo tradicionales son lentos y requieren trabajo y material excesivo. Las versiones modificadas facilitan la obtención rápida de resultados. Los métodos de ensayo no tradicionales se apoyan en principios físicos, químicos, inmunológicos o moleculares que han sido introducidos para complementar o reemplazar a los métodos de ensayo tradicionales. Los métodos rápidos son particularmente útiles en procedimientos modernos de sistemas de calidad y control, como son HACCP y las buenas prácticas de manufactura (BPM), para garantizar la calidad microbiana y la seguridad de los alimentos de manera preventiva.

La habilidad de un microorganismo de causar enfermedad está dictada en parte por su composición genética. En algunos casos, su virulencia radica en un solo gen. Si se detecta el gen, se detecta al patógeno. La Biología molecular ha transformado el diagnóstico microbiológico desde los tiempos de la hibridación de DNA:DNA (Southern), hasta la llegada de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pirosecuenciación y microarreglos. Ninguna de las técnicas de Biología molecular ha transformado la investigación y el diagnóstico microbiológico más que la PCR. El termociclador se ha convertido no sólo en un instrumento de laboratorio estándar, sino que es actualmente indispensable para el diagnóstico.

Existen diversos *kits* comerciales disponibles basados en la PCR para *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* y para la detección de *Norovirus*, entre otros microorganismos. Varios de estos ensayos basados en la PCR son empleados por agencias regulatorias de los Estados Unidos para realizar detección de patógenos en alimentos. La PCR es un herramienta y, como tal, posee fortalezas y debilidades.

- **Seguridad alimentaria y el empleo de métodos moleculares**

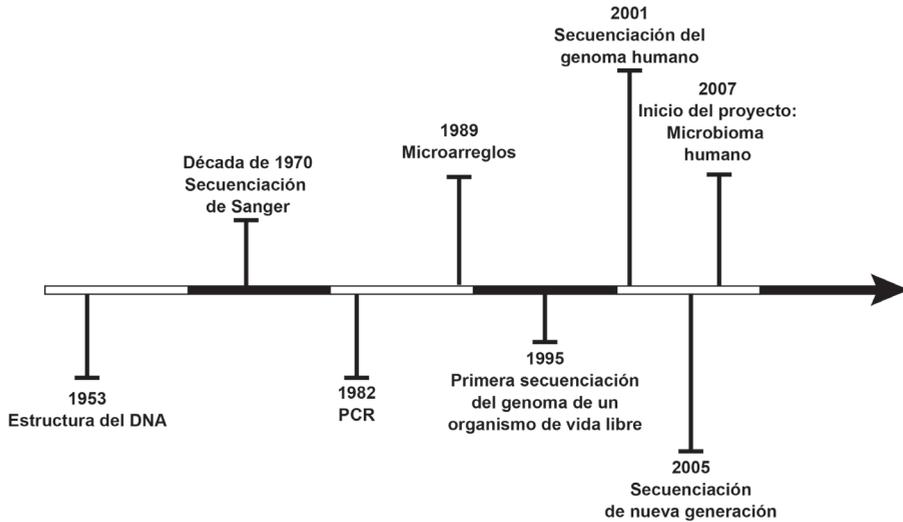
La morbilidad y la mortalidad como resultado del consumo de alimentos contaminados con microorganismos es, aún, un problema significativo en la sociedad

moderna. El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades en Estados Unidos (CDC) ha estimado que las enfermedades causadas por microorganismos transmitidos por alimentos son responsables de 76 millones de enfermos, 323 mil hospitalizaciones y 5 mil 200 muertes anuales en ese país.

Asegurar un alimento adecuado para el consumo es un gran reto para la industria alimentaria, y existen diversos factores que pueden impactar la probabilidad de contaminación y la subsecuente enfermedad. Estos factores incluyen un incremento en el consumo de productos que requieren un mínimo procesamiento, alimentos listos para comer y alimentos importados, la globalización de la industria alimentaria y los cambios en los métodos empleados para el control de la contaminación microbiana (por ejemplo, alimentos poco procesados, empaques con atmósfera modificada, métodos de conservación natural como bacteriocinas).

Debido a que los alimentos proveen tanto nutrientes como condiciones de crecimiento favorables para los microorganismos, la contaminación por patógenos continúa siendo de interés global. Algunos grupos de alimentos, notablemente los alimentos fermentados que incluyen quesos, yogurt, cerveza, vino, etc., no existirían sin los microorganismos que son responsables de su procesamiento.

El descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa y la secuenciación de DNA fueron avances que impactaron en la Biología y, por supuesto, en la Microbiología de alimentos (**Figura 18.1**). La importancia y relevancia de la PCR de manera particular son en parte debidas a las mejoras y modificaciones para adaptar el método a aspectos importantes de estudio, desde la secuencia de genomas, hasta la detección rápida de patógenos y la identificación filogenética. Para mayor detalle se recomienda revisar la siguiente página: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)



**Figura 18.1** Línea del tiempo con los avances importantes en las tecnologías moleculares con impacto en Microbiología de alimentos. Modificado de O'Flaherty & Klaenhammer, 2011.

Como los patógenos son microorganismos indeseables en alimentos, la habilidad para detectar e identificarlos es un área de suma importancia. Con las técnicas moleculares actuales es posible realizar una identificación rápida de cepas e incluso determinar sus factores de virulencia. En particular los patógenos transmitidos vía alimentos como *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. entérica subsp. enterica* han recibido mucha atención a este respecto. Los métodos moleculares para la identificación de bacterias han evolucionado en un corto periodo de tiempo.

Hoy en día, los métodos basados en la PCR son empleados principalmente para detectar, identificar y cuantificar poblaciones bacterianas tanto benéficas como patogénicas. Los estándares tipo ISO establecen y ofrecen guías para detectar cualitativamente patógenos transmitidos por alimentos.

Comparado con los métodos basados en cultivo, la PCR es más rápida, sensible y específica; además permite la detección de poblaciones sub-representadas, incluso en ausencia de un medio de cultivo de enriquecimiento selectivo o en presencia de otra población dominante. Más aún, permite la detección de células muertas o viables, pero no cultivables.

- **La reacción en cadena de la polimerasa**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha convertido en una importante herramienta de diagnóstico en la detección de patógenos transmitidos por los alimentos. Diversas pruebas basadas en la PCR han sido validadas, armonizadas, y comercializadas para hacer de la PCR una herramienta estándar en Microbiología de alimentos.

La PCR es una técnica que se utiliza para amplificar una sola o varias copias de un fragmento de DNA (ácido desoxirribonucleico), para generar miles de millones de copias. Permite la caracterización y comparación de material genético de diferentes individuos y organismos de manera más sencilla. En pocas palabras, se trata de una "máquina copiadora para moléculas de DNA". La PCR representó una revolución en las técnicas biológicas cuando fue desarrollada por primera vez en 1983 por Kary Mullis, quien ganó el Premio *Nobel* de Química en 1993, por su trabajo en el uso y desarrollo de la misma. Esta innovadora técnica permite reproducir el proceso natural de replicación de DNA de una célula en un tubo de ensayo.

En el tubo de ensayo, estas reacciones pueden recrearse usando calor (por ejemplo, 94 °C) para producir la cadena sencilla (molde) de DNA, y con un oligonucleótido se inicia la síntesis de la cadena de DNA complementaria. Con la adecuada concentración de sales, pH y un suministro de nucleótidos, la DNA polimerasa purificada puede sintetizar ambas cadenas de DNA, produciendo la correspondiente molécula de DNA de doble cadena. El primero determina si y dónde puede ser iniciada la síntesis de DNA. El tamaño del fragmento de DNA generado es una función de la distancia entre los dos primeros.

Para producir una nueva cadena de DNA *in vitro* se requieren tres pasos: A) la desnaturalización (94 °C) para separar ambas cadenas de DNA; B) reacción de amplificación (30 ciclos), una vez separada la doble cadena, los primeros son agregados en exceso en comparación con el DNA a ser amplificado. Éstos se alinean e hibridizan con la cadena complementaria de DNA y están orientados mirando hacia su extremo 3', de tal forma que la polimerasa (la cual cataliza la síntesis de la nueva cadena en sentido 5' → 3') se extiende a través del segmento de DNA entre ellos (extensión). Una ronda de síntesis resulta en cadenas nuevas de longitud indeterminada, las cuales, como las cadenas parentales, pueden hibridizar a los primeros, nuevamente en otra ronda de síntesis.

Estos productos se acumulan en forma aritmética en cada ciclo subsecuente de “desnaturalización – alineamiento de *primers* – síntesis”. Sin embargo, el segundo ciclo de “desnaturalización – alineamiento – síntesis” produce dos cadenas sencillas que componen un producto de doble cadena, el cual es exactamente del mismo tamaño que la región delimitada por los *primers* sobre el templado original. Cada cadena de este producto es complementaria a uno de los dos *primers* y puede participar en rondas subsecuentes de amplificación, como templado. La cantidad de este producto de doble cadena se duplica después de cada ronda o ciclo de síntesis, desnaturalización y alineamiento, acumulándose exponencialmente; el número de eventos de replicación está dado por la expresión  $2^n$ , donde “ $n$ ” es el número de ciclos de amplificación. C) Extensión final (1 ciclo), en donde, después del último ciclo, la reacción se mantiene a 72 °C para permitir que la polimerasa termine de sintetizar todos los fragmentos que pueden haber quedado incompletos.

Los componentes esenciales de las reacciones de PCR son: la enzima polimerasa, *primers*, dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfatados, *buffer* y cationes. Cada reacción de PCR contiene una polimerasa termoestable, como Taq polimerasa, o bien, DNA polimerasa. La DNA polimerasa se aisló originalmente de la bacteria *Thermus aquaticus*, por Thomas Brock en 1965. *T. aquaticus* es una bacteria que vive en las aguas termales y respiraderos hidrotermales, y tiene una enzima DNA polimerasa que puede soportar las condiciones desnaturalizantes de proteínas que son requeridas durante la PCR. Por lo tanto, sustituyó a la DNA polimerasa de *Escherichia coli* que se utilizó originalmente en la PCR. La temperatura óptima para la actividad de la DNA polimerasa es 75 a 80 °C, y tiene una vida media de 40 min a 95 °C y 9 minutos a 97.5 °C, aunque puede replicar una hebra de mil pares de bases de DNA en menos de 10 s a 72 °C.

La DNA polimerasa requiere un catalizador en forma de catión divalente, ya sea como magnesio ( $Mg^{2+}$ ) o manganeso ( $Mn^{2+}$ ). Estos cationes también sirven como un co-factor y ayudan a estabilizar las dos cadenas de DNA. La concentración habitual de  $Mg^{2+}$  en la reacción de PCR es de aproximadamente 2.5 mM. La concentración correcta de cationes es fundamental, porque mayores concentraciones pueden promover una mayor inespecificidad de la Taq polimerasa.

Sin embargo, en este proceso teórico que se ha descrito pueden influir numerosos factores que hagan que la reacción no sea realmente específica o que su eficiencia no sea la adecuada, de manera que la amplificación no ocurra en la progresión esperada y, por tanto, no sea sensible. Entre los muchos factores que pueden influir en el resultado final de la PCR son destacables el diseño apropiado

de los cebadores, la calidad y concentración del DNA, la concentración de magnesio, el tipo y la cantidad de DNA polimerasa y el programa de amplificación.

Uno de los factores que llevan al éxito en la implementación de la PCR para la identificación de microorganismos patógenos es la elección correcta de la secuencia blanco. Esta secuencia debe permitir la identificación del microorganismo de interés, independientemente de la presencia de otras fuentes de DNA (de microorganismos contaminantes o de la muestra misma).

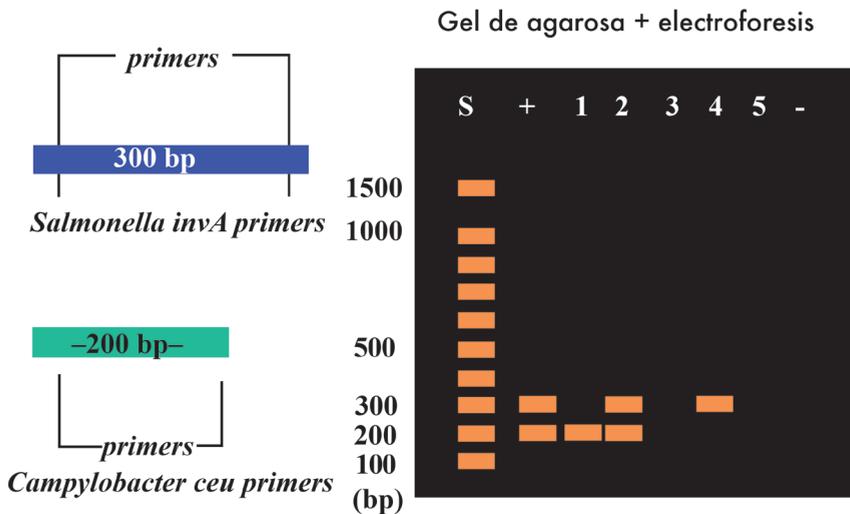
En años recientes se han presentado variantes de la PCR, entre las que destacan la PCR en tiempo real y la PCR múltiple; en ambas, el fundamento de la técnica es el mismo que la denominada PCR de punto final. El ensayo de PCR fue desarrollado originalmente para detectar una única secuencia o patógeno. A medida que más genes o secuencias fueron identificadas para la detección de patógenos por PCR, el número de ensayos de PCR para diagnóstico de laboratorio creció rápidamente. Dependiendo del alimento a analizar, la prevalencia de patógenos y el número de células y los requisitos del cliente, un laboratorio puede requerir un mínimo de tres pruebas de PCR separadas. La progresión natural en la evolución del diagnóstico basado en la PCR era hacia una sola prueba para la detección de múltiples patógenos, patotipos, serovares, tipos de fagos y tipos de cepas. El PCR multiplex fue el siguiente paso lógico, un único ensayo de PCR que combina múltiples *primers* para la detección de múltiples patógenos o cepas.

Cada grupo de *primers* fue diseñado para producir un fragmento con un tamaño definido para el patógeno o la cepa a probar. Los primers de PCR se diseñaron para producir un tamaño de amplicón (se denomina así al producto obtenido de la reacción de PCR) único y específico para el gen o la secuencia blanco (**Figura 18.2**). Por lo tanto, basándose en el tamaño del amplicón producido por PCR, es posible identificar el patógeno o la cepa presente en la muestra problema. Esta herramienta se ha vuelto indispensable no sólo en la detección de patógenos específicos, sino también en la tipificación bacteriana y en los aislados virulentos. El ensayo de PCR multiplex incluso se ha adaptado para PCR en tiempo real.

Con este fin, algunos parámetros, como la concentración de magnesio y de *primers*, y el tipo y la cantidad de ADN polimerasa, pueden ajustarse experimentalmente. Para otros, en cambio, debe realizarse un diseño exhaustivo previo. En el caso de los cebadores y el programa de temperaturas utilizado, es necesario tener en cuenta varias premisas: a) escoger o diseñar oligonucleótidos que no interaccionen entre sí, es decir, que no formen oligómeros; b) que tengan temperaturas de alineamiento similares; c) que cada pareja amplifique una única

secuencia diana, y d) que generen amplicones de tamaño suficientemente diferente para poder ser separados y diferenciados tras la amplificación. En cuanto a la calidad y cantidad de DNA molde, por supuesto, debemos intentar partir de la concentración menor posible y con ausencia de sustancias inhibitoras que puedan interferir en la reacción. Para ello, los protocolos de purificación variarán en función del tipo de muestra de partida.

La PCR múltiple se proyecta como una herramienta de diagnóstico muy útil en el futuro inmediato, aunque los métodos clásicos (pruebas bioquímicas y aislamientos) no pueden dejarse de lado, y deben ir en paralelo, para corroborar los resultados de las pruebas moleculares. Por último, es conveniente recordar que la PCR es una técnica que, por su aparente simplicidad y su alta sensibilidad, es muy susceptible de errores de ejecución y de contaminaciones, por lo que la introducción de la PCR múltiple en los laboratorios de Microbiología requiere una formación especializada previa del personal que ejecute los análisis.



**Figura 18.2** PCR multiplex. Los *primers* para el PCR son diseñados para alinearse con secuencias específicas y únicas del patógeno *Salmonella* (*invA*) y *Campylobacter* (*ceu*) y también produce un amplicón de tamaño que es único para el patógeno que está siendo probado: *Salmonella* 300 pb y *Campylobacter* 200 pb. Los *primers* y el programa de PCR son diseñados para que ambos *primers* puedan trabajar adecuadamente en la misma reacción. Un solo ensayo para dos patógenos. También puede realizarse la amplificación de dos secuencias del mismo patógeno.

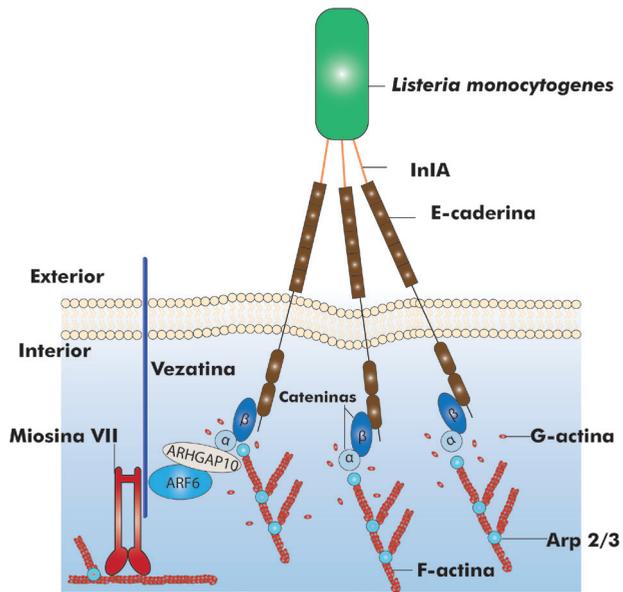
- ***Listeria monocytogenes***

Los seres humanos están rodeados de una increíble abundancia de diversos microorganismos. Las estimaciones indican que la flora que vive en la boca humana es > 500 especies y en el tracto gastrointestinal es > 2 000 especies. Dada su gran abundancia y diversidad, es destacable tener en cuenta que sólo una pequeña proporción de estos microorganismos son causa de enfermedades humanas.

La bacteria Gram positiva *Listeria monocytogenes* es un patógeno ubicuo que se desarrolla en diversos ambientes, tales como suelo, agua, diversos productos alimenticios, seres humanos y animales. La enfermedad causada por esta bacteria, listeriosis, se adquiere por la ingestión de alimentos contaminados y afecta principalmente a personas inmunocomprometidas, mujeres embarazadas y recién nacidos. La listeriosis se manifiesta como la gastroenteritis, meningitis, encefalitis, infecciones de la madre al feto y la septicemia, lo que resulta en muerte del 25-30% de los casos. Seguida de la ingestión, *L. monocytogenes* cruza la barrera intestinal invadiendo primero el epitelio, y de ahí obteniendo con ello el acceso a los órganos internos. Durante infecciones graves, llega al cerebro, provocando meningitis y en las mujeres embarazadas es capaz de cruzar la barrera fetoplacentaria, lo que conduce a la infección del feto.

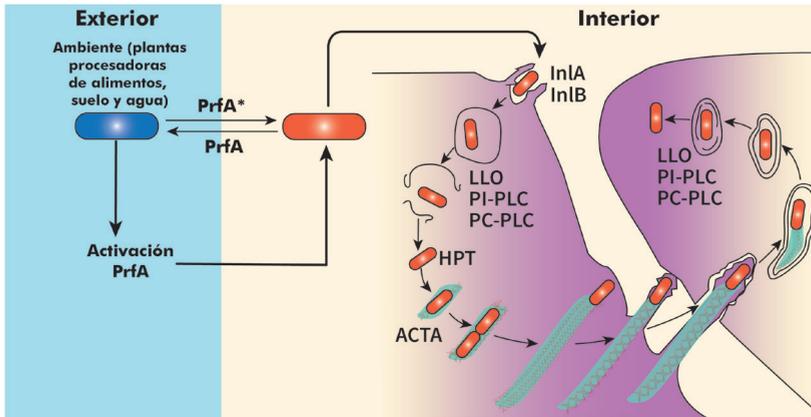
*L. monocytogenes* es una bacteria intracelular facultativa. Su ciclo de vida refleja su notable adaptación para la supervivencia intracelular y multiplicación en macrófagos y otros tipos de células. Similar a la situación para la diversos patógenos, la invasión de macrófagos por *L. monocytogenes* es un proceso pasivo, pero la entrada a los fagocitos es inducida por la unión de las proteínas de la superficie bacteriana, llamadas *internalina A (InIA)* e *internalina B (InIB)*, a los receptores en la célula del huésped. Ambas invasinas son necesarias y suficientes para la entrada bacteriana en diversos tipos celulares como enterocitos, hepatocitos, fibroblastos, células epiteliales y células endoteliales, pero la entrada mediada por *InIA* se limita a un pequeño número de tipos celulares que expresan dicho receptor (**Figura 18.3**).

La entrada de *L. monocytogenes* en células de mamífero es un proceso dinámico que requiere la polimerización de la actina y la remodelación de la membrana, por ello es un excelente ejemplo de cómo una bacteria puede manipular la señalización de las células del hospedero y las vías endocíticas a su conveniencia.



**Figura 18.3** Mecanismo de invasión bacteriana inducida por InIA. El receptor para la proteína InIA de *Listeria monocytogenes* es la E-caderina. Algunos componentes que son importantes para las uniones adherentes son reclutados al sitio de entrada bacteriano donde ocurren los rearrreglos del citoesqueleto que son requeridos para la invasión. ARF6, Factor de ADP-ribosilación 6; ARHGAP10. Proteína Rho activada por GTPasa; Arp, Proteína relacionada a actina; F-actina, filamentos de F-actina; G-actina, actina globular.

Casi todos los productos de los genes que contribuyen a la invasión bacteriana, la entrada citosólica, el crecimiento, la motilidad intracelular y la invasión de células adyacentes están regulados por el factor de transcripción PrfA (**Figura 18.4**).



**Figura 18.4** Mecanismo de acción del activador transcripcional PrfA. *Listeria monocytogenes* sobrevive en una amplia variedad de entornos, en diversos hábitats que incluyen el suelo y el agua, así como instalaciones de procesamiento de alimentos. La conexión entre la vida exterior e interior de los huéspedes mamíferos es el activador transcripcional PrfA, que regula la expresión de muchos genes que son necesarios para la virulencia bacteriana. Fuera de una célula huésped, PrfA existe en un estado de baja actividad, con niveles correspondientes a baja expresión de genes de virulencia. Una vez dentro del huésped, PrfA se activa (PrfA\*) e induce la expresión de productos génicos que son necesarios para la invasión de la célula huésped (internalinas *InlA* y *InlB*), lisis fagosómica (listeriolisina O (LLO), fosfatidilinositol fosfolipasa C (PI-PLC) y fosfatidilcolina (PC)-PLC), crecimiento intracelular (transportador de hexosa-6-fosfato (HPT)), y la propagación de célula a célula (proteína de ensamblaje de inducción de actina (ACTA)). Fuente: modificado de Freitag *et al.*, 2009.

El estudio de los aspectos más destacados de la infección por *L. monocytogenes* enfatiza la relación entre esta bacteria y su hospedero, y revela su adaptación recíproca y su co-evolución. Por décadas, *L. monocytogenes* ha sido una herramienta para los inmunólogos. Se ha convertido también en un paradigma de la patogénesis bacteriana y la microbiología celular. La disponibilidad de la secuencia del genoma de cinco serovar de *L. monocytogenes* y *L. innocua*, proporciona una mayor comprensión de las bases moleculares de las determinantes patogénicas de las especies de *Listeria*.

## SESIÓN UNO

### REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA, PCR

#### **SOLUCIONES, REACTIVOS E INDICADORES**

Juego de amplificación compuesto de:

- Taq polimerasa (Taq-DNA-polimerasa recombinante; Thermo-Scientific®) 1.25 U/  $\mu\text{L}$ .<sup>a</sup>
- $\text{MgCl}_2$  2.5 mM.<sup>a</sup>
- Amortiguador enzimático 10X (KCl 500mM; Tris:HCl 100 mM pH 8.8; Nonidet P40 0.8%).<sup>a</sup>
- Desoxirribonucleótidos (dNTP's: dATP, dTTP, dCTP, dGTP; 2 mM de cada uno).<sup>a</sup>
- Oligonucleótido *forward inIA* (*primer* o cebador *inIA Fw*).<sup>a</sup>
- Oligonucleótido *reverse inIA* (*primer* o cebador *inIA Rv*).<sup>a</sup>
- Oligonucleótido *forward inIC* (*primer* o cebador *inIC Fw*).<sup>a</sup>
- Oligonucleótido *reverse inIC* (*primer* o cebador *inIC Rv*).<sup>a</sup>
- Agua grado Biología molecular.<sup>a</sup>
- Hielo frapé.<sup>a</sup>
- DNA cromosomal obtenido de la extracción del alimento enriquecido en el medio caldo para enriquecimiento para *Listeria* (~1 ng/50  $\mu\text{L}$ ).<sup>a</sup>

#### **MATERIAL Y EQUIPO**

- Micropipetas de diversas capacidades (100 -1,000; 10 -100 y 0.5 -10  $\mu\text{L}$ ).<sup>a</sup>
- Portamicropipetas.<sup>a</sup>
- Hielera.<sup>a</sup>
- Microtubo de PCR 200  $\mu\text{L}$ .<sup>a</sup>
- Microtubo 1.5 mL.<sup>a</sup>
- Gradilla para microtubos.<sup>a</sup>
- Cajas con puntas amarillas NUEVAS (200  $\mu\text{L}$ ).<sup>a</sup>

- Cajas con puntas azules NUEVAS (1 000  $\mu$ L).<sup>a</sup>
- Cajas con puntas ultramicro NUEVAS (10  $\mu$ L).<sup>a</sup>
- 1 recipiente plástico para desechar puntas.<sup>a</sup>
- Termociclador *BioRad MyCycler*.<sup>a</sup>
- Guantes NUEVOS (cada alumno debe traer los suyos) .<sup>a</sup>

## NOTAS

<sup>a</sup>Material necesario al inicio de la práctica.

**Es obligatorio utilizar guantes a lo largo de todo el protocolo.**

## PROCEDIMIENTO

Se trabajará con el DNA cromosomal extraído a partir del medio de **enriquecimiento** de *Listeria monocytogenes*.

- Realizar la mezcla de reacción (*master mix*) para la cantidad de muestras a amplificar. En este caso cada equipo deberá considerar una reacción extra, ya que se deben considerar los errores de pipeteo.
- Descongelar los reactivos COLOCÁNDOLOS PREVIAMENTE EN REFRIGERACIÓN, O BIEN, EN BAÑO DE HIELO. Verificar que se encuentren perfectamente descongelados antes de su uso.
- Mantener los tubos que contienen la Taq-polimerasa, el DNA templado, los *primers* y los dNTP's a -20 °C hasta el momento de su uso.
- Centrifugar 10 000 rpm brevemente los microtubos conteniendo los reactivos antes de usarlos.
- En el orden especificado en la **Tabla 18.1**, preparar en un microtubo de 1.5 mL la mezcla de reacción. Considerar que las proporciones son solamente para **una reacción de amplificación**. Evitar en lo posible la formación de espuma. Asegurarse de colocar el volumen correcto en la micropipeta antes de tomar el reactivo. Cada reactivo deberá tomarse con una punta para micropipeta nueva.

**TABLA 18.1** PCR multiplex para *Listeria monocytogenes*. Concentraciones y proporciones de reactivos para una reacción de 50 µL.

Amortiguador 10X	5.0 µL
Cloruro de magnesio (2.5 mM)	5.0 µL
dNTP's (0.2 mM de cada uno)	1.0 µL
Primer forward <i>inIA</i> ( <i>inIA</i> fw) 1.0 µM	2.9 µL
Primer reverse <i>inIA</i> ( <i>inIA</i> rv) 1.0 µM	2.4 µL
Primer forward <i>inIC</i> ( <i>inIC</i> fw) 1.0 µM	2.8 µL
Primer reverse <i>inIC</i> ( <i>inIC</i> rv) 1.0 µM	2.8 µL
Agua grado Biología molecular (la necesaria para aforar a 50 µL)	25.85 µL
Enzima Taq polimerasa <i>ThermoScientific</i> ®	1.25 µL
DNA cromosomal	1.0 µL
Volumen total	50.0 µL

- Después de colocar la Taq polimerasa, invertir el microtubo de la master mix dos o tres veces, evitando la formación de espuma para lograr la homogenización de los reactivos.
- Transferir 49 µL de la master mix a un microtubo para PCR.
- Colocar el volumen de DNA templado descrito en la **Tabla 18.1**.
- Realizar una homogenización final de los reactivos mediante la aplicación de unos golpes ligeros en la parte baja del microtubo de PCR.
- Colocar los microtubos de PCR con la muestra a amplificar en el termociclador y realizar la programación descrita en la **Tabla 18.2** (la programación será realizada por los profesores adscritos al grupo).
- Al término del proceso de amplificación colocar los microtubos de PCR en congelación a -20 °C hasta la realización de la electroforesis en gel de agarosa 1%.

**TABLA 18.2** Condiciones de la PCR-múltiple para los genes *inIA* e *inIC* de *L. monocytogenes*.

Etapa	Número de ciclos		Condiciones
Desnaturalización inicial	1		95 °C/5 min
Amplificación	30	Desnaturalización	95 °C/1 min
		Alineamiento <i>primers</i>	58.7 °C/1 min
		Amplificación	72 °C/1.5 min
Extensión final	1		72 °C/5 min
Almacenamiento	1		4 °C/∞

## SESIÓN DOS

### EVALUACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES *inIA* E *inIC* DE *L. monocytogenes* MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1%

Prácticamente todos los protocolos en Biología molecular requieren, en algún momento, el fraccionamiento de los ácidos nucleicos. Existen técnicas cromatográficas que son apropiadas para algunas aplicaciones; por ejemplo, la separación entre ácidos nucleicos de cadena doble y de cadena sencilla, o bien, para la separación de plásmidos del DNA cromosomal o en la separación de DNA cromosomal de restos celulares. Sin embargo, la electroforesis en gel es una técnica con mayor resolución que cualquier método alternativo y es el método de fraccionamiento utilizado rutinariamente en el laboratorio de Biología molecular. Las separaciones electroforéticas pueden ser analíticas o preparativas y permiten la resolución de fragmentos en un rango de <math><1\ 000\ \text{Da}</math> a <math>>10^8\ \text{Da}</math>.

En general, el uso de electroforesis para separar ácidos nucleicos es una técnica muy sencilla. Los ácidos nucleicos están cargados de manera uniforme negativamente, además de que el DNA de doble cadena se encuentra razonablemente libre de complicaciones estructurales que puedan afectar su movilidad. Sin embargo, existen ciertas variables que afectan la migración de los ácidos nucleicos en un gel. Éstas incluyen la conformación de los ácidos nucleicos, el tamaño de poro del gel, el gradiente de voltaje aplicado y la concentración de sal en el amortiguador que se utiliza. La más básica de las variables es el tamaño de poro del gel, el cual determina el tamaño de los fragmentos que se pueden resolver. En la práctica, esto

significa que geles con un tamaño de poro mayor son utilizados para resolver fragmentos >500 a 1 000 pares de bases (pb o bp, por sus siglas en inglés).

**TABLA 18.3** Concentración de agarosa recomendada para separar fragmentos de DNA de varios tamaños.

Agarosa (%)	Rango efectivo de resolución de fragmentos de DNA lineal (en Kb)
0.5	30 a 1
0.7	12 a 0.8
1.0	10 a 0.5
1.2	7 a 0.4
1.5	3 a 0.2

### **SOLUCIONES, REACTIVOS E INDICADORES**

- 25 mL de agarosa 1% (P/V).<sup>b</sup>
- 200 mL de *buffer* TBE (tris-boratos-EDTA) de corrida para electroforesis.<sup>b</sup>
- Colorante de corrida (10 mM Tris-HCl (pH 7.6); 0.15% naranja G; 0.03% cianol FF-xileno; 60% glicerol; 60 mM EDTA).<sup>b</sup>
- Marcador de peso molecular de 1 Kbp (*Thermo-Scientific*®).<sup>b</sup>
- Solución de bromuro de etidio 0.04% (P/V; **cuidado: agente mutagénico**).<sup>b</sup>

### **MATERIAL Y EQUIPO**

- Horno de microondas.<sup>b</sup>
- Fuente de poder para electroforesis a 100 Volts y 90 mA.<sup>b</sup>
- Cámara de electroforesis.<sup>b</sup>
- Soporte para preparación de geles (charola, barras metálicas, peines).<sup>b</sup>
- Transiluminador UV (BioRad).<sup>b</sup>
- Guantes nuevos.<sup>b</sup>
- Lentes de seguridad o pantalla de acrílico.<sup>b</sup>
- Micropipetas 0.5 a 10  $\mu$ L.<sup>b</sup>
- Parafilm en cuadros de 1 x 3 cm.<sup>b</sup>

- Cajas con puntas amarillas NUEVAS (200  $\mu$ L).<sup>b</sup>
- Cajas con puntas ultramicro NUEVAS (10  $\mu$ L).<sup>b</sup>
- 1 recipiente plástico para desechar puntas.<sup>b</sup>

## NOTAS

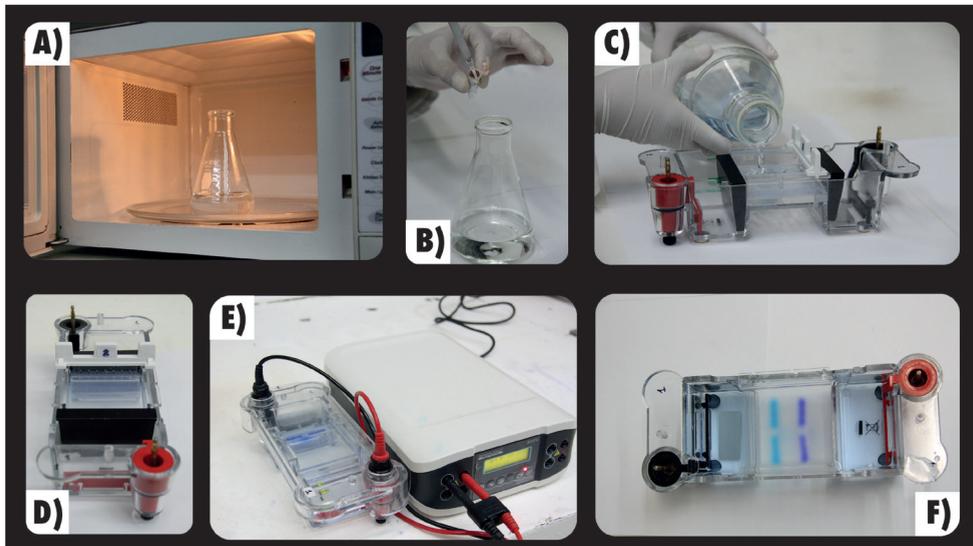
<sup>b</sup> Material necesario a las 48 h de iniciada la práctica.

**Es obligatorio utilizar guantes a lo largo de todo el protocolo.**

## PROCEDIMIENTO

### 1. Ensamble de la cámara de electroforesis

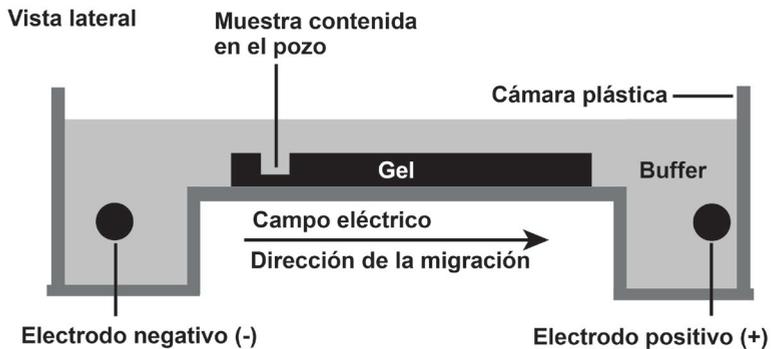
Colocar los componentes de la cámara de electroforesis de acuerdo con el **Esquema 18.1**.



**Esquema 18.1** Montaje de la cámara de electroforesis para verter la agarosa previamente fundida: A) Preparar solución de agarosa, B) Adicionar bromuro de etidio, C) Transferir a la base, D) Permitir solidificar la solución, E) Colocar el gel en la cámara, F) Gel posterior a la electroforesis.

## 1. Preparación del gel de agarosa al 1% (P/V)

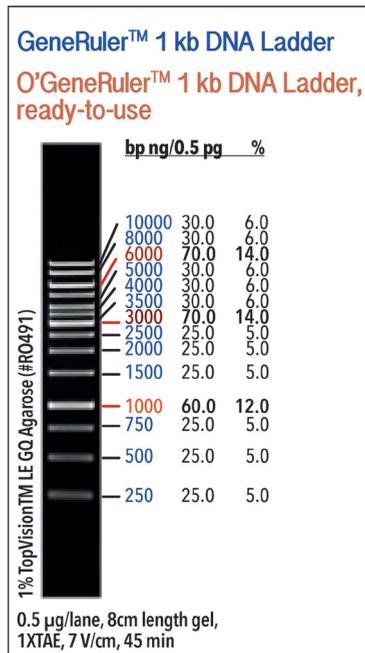
- Pesar 0.25 g de agarosa y agregarlo a un matraz de 125 mL. Agregar 25 mL de amortiguador TBE 1X.
- Fundir la agarosa contenida en el amortiguador TBE 1X en horno de microondas.
- Transferir la agarosa fundida a un tubo de centrifuga de 50 mL (exclusivo para geles con agente mutagénico) y enfriar aproximadamente a 50 °C.
- Agregar 5 µL de bromuro de etidio 0.04% e invertir el tubo 2 o 3 veces para mezclar los reactivos, evitando la formación de burbujas.
- Vaciar la agarosa en la base para preparación de geles y dejar enfriar.
- Una vez que ha solidificado el gel, retirar tanto el peine como las barras metálicas.
- Agregar suficiente amortiguador TBE 1X como para cubrir el gel 1-3 mm (**Esquema 18.2**).



**Esquema 18.2** Gel y amortiguador TBE1X contenidos en la cámara.

- Tomar 2 µL de marcador de peso molecular de 1 Kbp y colocarlos en el pozo correspondiente al carril 1 del gel.
- En un trozo de plástico Parafilm colocar 3 µL del colorante de carga, evitar en lo posible la incorporación de burbujas.
- Agregar dentro de la gota de colorante 5 µL de muestra a analizar, evitar en lo posible la incorporación de burbujas. Mezclar ambas soluciones.

- Succionar los 8  $\mu\text{L}$  de la mezcla muestra-colorante y depositarlos en un pozo del gel. Evitar en lo posible la incorporación de burbujas. Tener cuidado de no picar el gel con la punta de la pipeta ni depositar la muestra sobre el gel.
- Conectar los cables a la fuente de poder. El DNA migra del cátodo (polo negativo, cable negro) al ánodo (polo positivo, cable rojo).
- Encender la fuente de poder y dejar migrar de 1 a 10 V/cm de gel (100 volts/90 mA).
- Cuando el frente del colorante haya migrado a más de la mitad del gel, apagar la fuente de poder y revisar el gel en un transiluminador de luz ultravioleta. Verificar el tamaño de las bandas obtenidas de las muestras, tomando como referencia al marcador de PM.
- La presencia de *L. monocytogenes* en la muestra se verificará por la visualización de las bandas de los productos de amplificación de los genes *inlA* e *inlC*. Al respecto, el gen *inlA* posee un tamaño aproximado de 800 bp y el gen *inlC* un tamaño de 500 bp. El tamaño de las mismas deberá ser similar a la banda respectiva en el marcador de peso molecular mostrado en el **Esquema 18.3**.



**Esquema 18.3.** Marcador de peso molecular 1Kbp O'GeneRuler (*Thermo-Scientific*®).

## **ELIMINACIÓN DE RESIDUOS**

- Deseche los guantes en el recipiente rojo, de residuos biológico-infecciosos.
- Coloque los geles en la charola específica del residuo para que sean tratados posteriormente.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Klancnik A., Kovac M., Toplak N., Piskernik S. & Jersek B. (2012). PCR in food analysis. *IntechOpen Eur.* 195-212.

Begley M. & Hill C. (2010). Food Safety: What Can We Learn From Genomics? *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 1, 341-361. doi:10.1146/annurev.food.080708.100739

Freitag N.E., Port G.C. & Miner M.D. (2009). *Listeria monocytogenes* –from saprophyte to intracellular pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 623-628. doi:10.1038/nrmicro2171

Hamon M., Bierne H. & Cossart P. (2006). *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 423-434. doi:10.1038/nrmicro1413

Maurer J.J. (2011). Rapid Detection and Limitations of Molecular Techniques. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2, 259-279. doi:10.1146/annurev.food.080708.100730

O'Flaherty S., Klaenhammer T.R. (2011). The Impact of Omic Technologies on the Study of Food Microbes. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2, 353-371. doi:10.1146/annurev-food-030810-110338

Postollec F., Falentin H., Pavan S., Combrisson J., Sohier D. (2011). Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiol.* 28, 848-861. doi:10.1016/j.fm.2011.02.008

# ANEXO I

## MEDIOS DE CULTIVO

### Agua peptonada amortiguada

Ingredientes	Cantidad
Digerido enzimático de caseína	10.0 g
NaCl	5.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	9.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 g
Agua destilada	1.0 L

#### ***Preparación***

Disolver los ingredientes en el agua, calentar si es necesario. Ajustar el pH, de tal manera que después de la esterilización sea  $7.0 \pm 0.2$  a 25 °C. Distribuir el medio en frascos de capacidad necesaria para obtener las porciones de prueba. Esterilizar en autoclave a 121 °C/15 min.

#### ***Principio de acción***

La solución de agua peptonada, con amortiguador de pH  $7.0 \pm 0.2$ , solamente tiene como nutriente el digerido enzimático de caseína, este medio de cultivo no contiene fuente de carbono como nutriente, en realidad consta de fosfato dibásico de sodio y fosfato monobásico de potasio, cuya función es mantener el pH de 7.0 en la solución, además de conservar una isotonicidad celular, para lo que coadyuva el cloruro de sodio de esta formulación. Este medio de cultivo tiene como objetivo primordial eliminar el estrés de las células bacterianas.

**Arginina glucosa, agar (AAG)**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Peptona	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Triptona (tripticasa o digerido pancreático de caseína)	10.0 g
Cloruro de sodio	20.0 g
Glucosa	1.0 g
L-Arginina (hidrocloruro)	5.0 g
Citrato férrico amónico	0.5 g
Tiosulfato de sodio	0.3 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agar	13.5 g
Agua destilada	1.0 L

***Preparación***

Suspender los ingredientes en agua destilada, hervir hasta la disolución del agar y distribuir en cantidades de 5.0 mL. Ajustar el pH de 6.8 a 7.0. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 10 a 12 minutos. Dejar solidificar el medio inclinado.

***Principio de acción***

El aminoácido L-arginina es catabolizado (degradado) por medio de dos sistemas que pueden ocurrir de manera simultánea o separada. Estas dos vías metabólicas son el sistema de la arginina dehidrolasa y el sistema de la arginina descarboxilasa.

En el sistema descarboxilasa, la L-arginina sufre una descarboxilación para producir agmatina, una posterior degradación de la agmatina ocurre por una de dos vías metabólicas; si está presente la enzima agmatina ureohidrolasa, se formará putrescina más urea y, a su vez, si está presente la ureasa, se producirán dos moléculas de amoníaco y dióxido de carbono; en cambio, si no se encuentra la enzima agmatina ureohidrolasa, sino la enzima agmatina desiminasa, se produ-

circá putrescina por medio de un compuesto intermediario N-carbamoilputrescina, más dióxido de carbono y dos moléculas de amoniaco.

En el sistema dehidrolasa, la degradación de la L-arginina ocurre en un proceso de dos pasos: primero una degradación del aminoácido a L-citrulina, seguida por un sistema que fracciona la citrulina. La reacción global produce la formación de L-ornitina, dióxido de carbono y amoniaco a partir del sustrato L-arginina.

Un cambio rápido e intenso del indicador de pH a la alcalinidad indica que el catabolismo de la L-arginina se debió al sistema arginina dehidrolasa. Un cambio más débil y más lento del pH, sin la formación de amoniaco, ocurre cuando la L-arginina es degradada por el sistema de arginina descarboxilasa. Sin embargo, el factor tiempo no es una manera confiable de determinar cuál fue la vía utilizada.

### **Baird Parker, agar**

#### **Medio base**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Peptona de caseína	10.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Extracto de carne	5.0 g
Glicina	12.0 g
Cloruro de litio	5.0 g
Piruvato de sodio	10.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	950.0 mL

#### ***Preparación***

Suspender 58.0 g del medio en 950 mL de agua y calentar con agitación constante, dejando hervir durante un minuto; posteriormente, esterilizar a  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1.0\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Enfriar y mantener el medio a  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Solución de telurito de potasio**

Ingredientes	Cantidad
Telurito de potasio	1.0 g
Agua destilada	100.0 mL

**Preparación**

Preparar una solución de telurito de potasio al 1% en agua, esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. La solución puede ser almacenada por varios meses a una temperatura entre 0 y 5 °C.

**Emulsión de yema de huevo**

Ingredientes	Cantidad
Yema de huevo	60.0 mL
Solución salina isotónica (NaCl 0.85%); c.b.p.	90.0 mL

**Preparación**

La preparación de la emulsión de yema de huevo también se realiza por separado, para lo cual, lavar los huevos frescos con agua y jabón; enseguida, limpiar los cascarones con una solución de tintura de yodo (solución alcohólica al 2%), o bien, sumergirlos en una solución de cloruro mercúrico (1:1000); enjuagar con agua estéril y secar con gasa también estéril. En una campana de flujo laminar o en condiciones asépticas, abrir los huevos y vaciarlos en un separador de claras estéril. Transferir las yemas en una probeta, hasta un volumen de 60.0 mL y completar a 90.0 mL con solución salina isotónica estéril; posteriormente, verter la emulsión a un matraz Erlenmeyer que contenga perlas de vidrio estériles y agitar fuertemente para que se forme la emulsión, después se filtra sobre gasa estéril.

**Composición total del medio**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Medio base	95.0 mL
Solución de telurito de potasio	1.0 mL
Emulsión de yema de huevo	5.0 mL

**Preparación**

Mezclar perfectamente bien los ingredientes, manteniendo el medio a 45 °C; posteriormente, repartir en cajas de Petri entre 15.0 y 20.0 mL de este medio, dejar enfriar hasta la solidificación del medio. Las cajas pueden almacenarse hasta por 48 h después de su preparación, conservándolas a una temperatura entre 0 y 5 °C.

**Principio de acción**

*S. aureus* tiene la capacidad de reducir el telurito de potasio ( $K_2O_3Te$ ) a telurio metálico (Te), por esta razón las colonias se presentan de color negras metálicas, de acuerdo con la siguiente reacción:



Las lecitinas son fosfoglicéridos, cuya estructura corresponde a ésteres de ácidos grasos unidos con el ácido fosfórico, glicerol y colina; son componentes normales de la yema de huevo. Las lecitinas pueden ser hidrolizadas por enzimas denominadas lecitinasas, existen 4 tipos de ellas: A, B, C y D, siendo la C la producida generalmente por las bacterias; los productos de dicha hidrólisis son ácido fosfórico y colina, por esta razón las colonias de *S. aureus* patógeno, al llevar a cabo la hidrólisis de la lecitina, forman halos transparentes alrededor de la colonia negra (reducción del telurito); además, al romperse las uniones lipoprotéicas, se liberan grasas que son insolubles en el medio, provocando una opalescencia alrededor de la colonia.

**Bilis rojo violeta, agar**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Peptona de carne	7.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Lactosa	10.0 g
Mezcla de sales biliares	1.5 g
Rojo neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.002 g
Agar	13.0 g
Agua destilada	1.0 L

***Preparación***

Suspender perfectamente los ingredientes del medio en 750 mL de agua; posteriormente, ajustar el pH a  $7.4 \pm 0.1$  y esterilizar en matraz durante 30 minutos en baño de agua hirviendo. No esterilizar en autoclave, usar pronto después de preparar, no recalentar.

***Principio de acción***

La mezcla de sales biliares inhibe el desarrollo de bacterias Gram positivas, permitiendo el desarrollo de bacterias coliformes Gram negativas. El cristal violeta inhibe el desarrollo de la microbiota Gram positiva. La lactosa favorece a este grupo, que la fermenta produciendo ácido que hace virar el indicador a rojo.

**Bilis verde brillante con lactosa, caldo (BRILA)**

Ingredientes	Cantidad
Bilis de buey deshidratada	20.0 g
Lactosa	10.0 g
Peptona de gelatina	10.0 g
Verde brillante	0.0133 g
Agua destilada	1.0 L

**Preparación**

Disolver los ingredientes en 1.0 L de agua destilada. Agitar constantemente para ayudar a la disolución, ajustar el pH si es necesario y distribuir en tubos de ensaye con campanas de Durham. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

**Principio de acción**

Es un medio selectivo para la detección de microorganismos coliformes. La lactosa es la principal fuente de carbono; ésta es hidrolizada por la enzima  $\beta$ -D-galactosidasa presente en las bacterias coliformes, produciendo glucosa y galactosa, monómeros que, secuencialmente, son metabolizados hasta ácidos y CO<sub>2</sub>; este último subproducto se detecta en las campanas de fermentación de Durham después de incubar de 24 a 48 h. La peptona es la fuente de carbono secundaria y principal fuente de nitrógeno, de aminoácidos esenciales y azufre.

Este medio de cultivo posee dos inhibidores bacterianos: las sales biliares y el verde brillante. Las sales biliares inhiben el crecimiento de microorganismos Gram positivos y también tienen efecto tóxico sobre algunos microorganismos Gram negativos. Las sales biliares se presentan como derivados del ácido cólico y desoxicólico, su estructura química básica es la de ciclo pentano perhidrofenantreno.

El verde brillante es un colorante que inhibe el desarrollo de bacterias Gram positivas y la mayoría de bacilos Gram negativos, excepto los coliformes. Incluso suprimen el crecimiento de los microorganismos anaerobios fermentadores de la lactosa como el *Clostridium perfringens*, que daría reacciones falsas positivas.

**Catalasa, prueba de**

Ingredientes	Concentración
Peróxido de hidrógeno	3%

Utilizar solución de peróxido de hidrógeno al 3%. Esta solución es muy inestable y debe someterse a un control de calidad en forma diaria o inmediatamente antes de su uso. Ocurre un burbujeo vigoroso o formación de espuma (que indica una reacción positiva) cuando se agrega una gota de peróxido de hidrógeno sobre una placa de agar con sangre, debido a la catalasa presente en los glóbulos rojos. Puede utilizarse una placa con agar chocolate para el control negativo, ya que los glóbulos rojos fueron destruidos.

**Principio de acción**

El peróxido de hidrógeno es el producto final del metabolismo oxidativo de carbohidratos, esta vía metabólica recibe el nombre de *metabolismo aerobio-oxidativo*. El  $H_2O_2$ , si se acumula, es tóxico para las bacterias y produce su muerte. La catalasa puede descomponer el  $H_2O_2$  u oxidar sustratos secundarios, obteniendo agua y oxígeno.

**Celobiosa, polimixina B y colistina, agar modificado con (mCPC)****Solución 1**

Ingredientes	Cantidad
Peptona	10.0 g
Extracto de carne	5.0 g
Cloruro de sodio	20.0 g
Solución <i>stock</i> de colorante 1 000 X	1.0 mL
Agar	15.0 g
Agua destilada	900.0 mL

**Preparación**

Ajustar el pH a 7.6. Hervir hasta que se disuelva el agar.

Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121 °C. Enfriar de 48-55 °C.

**Solución *stock* de colorantes 1 000 X**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Azul de bromotimol	4.0 g
Rojo de cresol	4.0 g
Etanol al 95%	100.0 mL

***Preparación***

Para obtener un color firme del medio, usar una solución colorante *stock* en lugar de estar pesando repetidamente los colores en polvo. Disolver el colorante en etanol hasta obtener una solución al 4% (peso/volumen). Agregar 1.0 mL de esta solución a cada litro de agar mCPC, la cual tendrá al final 40.0 mg de azul de bromotimol y 40.0 mg de rojo cresol por litro.

**Solución 2**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Celobiosa	10.0 g
Colistina	400 000.0 UI
Polimixina B	100 000.0 UI
Agua destilada	100.0 mL

***Preparación***

Disolver la celobiosa por calentamiento en agua destilada. Enfriar y agregar los antibióticos. Esterilizar por filtración.

**Celobiosa, polimixina B y colistina, agar modificado con (mCPC)****Composición total del medio**

Agregar la solución 2 a la solución 1, mezclar y distribuir en cajas de Petri.

**Principio de acción**

Medio empleado para diferenciar *V. vulnificus* de otros vibrios. Las cepas de *Vibrio* con excepción de *Vibrio cholerae* O1 (biotipo clásico) desarrollan en el medio CPC, mientras que la mayoría de las cepas de *V. parahaemolyticus* no desarrollan en éste. Si se presenta, las colonias aparecen violeta-verdosas debido a la no fermentación de la celobiosa. El agar CPC contiene extracto de carne y peptona de tejido animal, que proporcionan compuestos nitrogenados orgánicos esenciales para el desarrollo de los vibrios. La celobiosa se fermenta por algunos vibrios produciendo ácido, detectándose con el indicador azul de bromotimol, el cual vira a amarillo (pH ácido). El rojo de cresol es el indicador en condiciones alcalinas, el cual en pH alcalino vira a rojo. El pH alcalino del medio mejora la recuperación de los vibrios. La mezcla de celobiosa-polimixina-colistina mejora el desarrollo de *V. vulnificus* de otros vibrios.

**Cerebro corazón, infusión (BHI, caldo)**

Ingredientes	Cantidad
Infusión de cerebro de ternera	200.0 mL
Infusión de corazón de res	250.0 mL
Peptona de gelatina	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato dibásico de sodio, dodecahidratado	2.5 g
Glucosa	2.0 g
Agua destilada	1.0 L

**Preparación**

Disolver los ingredientes en el agua; posteriormente, distribuir en matraces o tubos de acuerdo con la monografía correspondiente y esterilizar a  $121 \pm 1.0$  °C durante 15 minutos.

**Principio de acción**

Los componentes de la infusión de cerebro de ternera y de la infusión de corazón de res hacen del medio BHI un medio de cultivo de enriquecimiento ideal para microorganismos con requerimientos nutricionales exigentes.

**Citrato de Simmons, agar**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Sulfato de magnesio	0.2 g
Fosfato dihidrogenado de amonio	1.0 g
Fosfato dipotásico	1.0 g
Citrato de sodio tribásico	2.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Azul bromotimol	0.08 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1.0 L
pH	7.0 ± 0.2

**Preparación**

Disolver los ingredientes en 1.0 L de agua destilada, agitar constantemente para ayudar a la disolución, ajustar el pH si es necesario. Calentar a ebullición para disolver completamente los ingredientes y distribuir en tubos de ensaye. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Inclinar los tubos después de esterilizar. Enfriar antes de su uso y conservar en refrigeración (4-10 °C). La caducidad es aproximadamente de 6-8 semanas.

**Principio de acción**

El agar citrato de Simmons se recomienda para la diferenciación de la familia *Enterobacteriaceae*, basada en la capacidad de utilizar el citrato como única fuente de carbono.

La energía puede ser proporcionada a algunas bacterias en ausencia de fermentación o producción de ácido láctico por la utilización del citrato como única fuente de carbono. Los microorganismos podrán introducir el citrato al citoplasma por una permeasa, donde ocurre un desdoblamiento a través de la enzima citrato oxaloacetato liasa, dando como productos acetato, formato, lactato y/o dióxido de carbono. El medio contiene también sales inorgánicas de amonio. Un microorganismo que puede utilizar el citrato como fuente de carbono también utiliza las

sales de amonio como única fuente de nitrógeno, éstas son degradadas a amoníaco alcalinizando el medio, con lo cual se genera el virre del indicador azul de bromotimol de verde a pH neutro a un color azul a pH alcalino, considerándose de esta forma la reacción como positiva.

Los fosfatos actúan como amortiguador de pH y el cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico.

**Coagulasa, prueba de  
Formulación con plasma de conejo liofilizado**

Ingredientes	Cantidad
Plasma de conejo liofilizado	*
Etilendiaminotetracético (EDTA; anticoagulante)	0.1%

\* Seguir instrucciones del fabricante.

**Formulación con plasma de conejo deshidratado**

Ingredientes	Cantidad
Plasma de conejo liofilizado	1 parte
Agua estéril	3 partes

Emplear plasma de conejo liofilizado rehidratado, siguiendo las instrucciones del fabricante. El anticoagulante que se debe utilizar para obtener el plasma es ácido etilendiaminotetracético (EDTA) al 0.1% en plasma rehidratado. Si se utiliza plasma deshidratado, diluir con agua estéril en proporción 1:3. Puede utilizarse plasma de conejo liofilizado adicionado de EDTA. No debe emplearse plasma de sangre citratada.

***Principio de acción***

El plasma, en presencia de la enzima coagulasa bacteriana, forma un coágulo de fibrina. El mecanismo está dado porque la protrombina, en presencia de sales de calcio y la enzima trombocinasa (tromboplastina), forman la trombina y esta última, al encontrarse frente al fibrinógeno, forma un coágulo de fibrina. La técni-

ca para determinar la coagulasa ligada o factor de agregación se realiza en un portaobjetos. Es responsable de la absorción del fibrinógeno, el cual precipita sobre los estafilococos, propiciando la agregación de estos microorganismos, observándose una aglutinación celular. En este caso, el factor de agregación transforma el fibrinógeno en fibrina de manera directa, no toman parte los factores plasmáticos, tampoco se inhibe por los anticuerpos contra la coagulasa libre. La prueba de la coagulasa en tubo detecta tanto la coagulasa libre como la ligada; la coagulasa libre extracelular reacciona con una sustancia denominada *factor de reacción de la coagulación*, que se abrevia CRF (sustancia termoestable parecida a la trombina), formando un complejo, el cual transforma el fibrinógeno en fibrina, liberando péptidos. En este caso, el CRF reacciona con la coagulasa, sin necesitar iones de calcio para formar el coágulo.

**Cuenta estándar, agar (ver triptona glucosa extracto de levadura; TGELA)**

**DNA, agar**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Tripteína	20.0 g
Agar	15.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Ácido desoxirribonucleico	2.0 g
Agua	1.0 L

***Preparación***

Mezclar todos los ingredientes, agitar hasta la disolución del ácido desoxirribonucleico, calentar a ebullición. Esterilizar a  $121 \pm 1.0$  °C durante 15 minutos. Enfriar a 45 °C. Posteriormente, repartir en cajas de Petri entre 15.0 y 20.0 mL de este medio, dejar enfriar hasta la solidificación del medio. Las cajas pueden almacenarse hasta por 48 h después de su preparación, conservándolas a una temperatura entre 0 y 5 °C.

**Principio de acción**

En el medio de cultivo, la tripteína es la fuente de nitrógeno, aminoácidos y aporta los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano. El ácido desoxirribonucleico (DNA) se encuentra en grado altamente polimerizado, y es el sustrato de la enzima desoxirribonucleasa (DNAsa), la cual lo hidroliza. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante. Este medio de cultivo permite diferenciar bacterias que poseen la enzima desoxirribonucleasa de aquellas que no la poseen. La presencia de la enzima se puede detectar mediante el agregado de ácido clorhídrico 1N. El ácido desoxirribonucleico hidrolizado presenta transparencia; mientras que el ácido desoxirribonucleico polimerizado precipita y torna opaco al medio de cultivo.

En algunas variantes de este agar se puede usar azul de orto-toluidina como revelador (añadido previamente al medio), el cual al estar en contacto con el DNA es de color azul y cambia a tono rosa cuando se genera el hidrolizado de DNA.

**EC, caldo (*Escherichia coli*, caldo para)**

Ingredientes	Cantidad
Bacto triptosa	20.0 g
Bacto lactosa	5.0 g
Bacto sales biliares No. 3	1.5 g
Fosfato dipotásico	4.0 g
Fosfato monopotásico	1.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agua destilada	1.0 L

**Preparación**

Disolver los ingredientes en 1 L de agua destilada, ajustar el pH si es necesario y distribuir en tubos de ensaye con campanas de Durham. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

### **Principio de acción**

Es un medio selectivo para la detección de microorganismos coliformes. La lactosa es la principal fuente de carbono; ésta es hidrolizada por la enzima  $\beta$ -D- galactosidasa presente en las bacterias coliformes, generándose como subproductos glucosa y galactosa que, secuencialmente, son metabolizados hasta ácidos y  $\text{CO}_2$ ; este último se detecta en las campanas de Durham.

Debido a que la fermentación se lleva a cabo a 44.5 o 45.5 °C, la prueba positiva indica presencia de *Escherichia coli*. La triptosa es la fuente de carbono secundaria y principal de nitrógeno, aminoácidos esenciales y azufre. Los fosfatos de potasio regulan el pH, el cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico y las sales biliares inhiben el crecimiento de bacterias de ambiente no entérico. El verde brillante inhibe el desarrollo de las bacterias Gram positivas.

### **EC-MUG, caldo (*Escherichia coli*, caldo con metilumbeliferil glucurónido)**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Bacto triptosa	20.0 g
Bacto lactosa	5.0 g
Bacto sales biliares No. 3	1.5 g
Fosfato dipotásico	4.0 g
Fosfato monopotásico	1.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
MUG (4metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucurónido)	0.050 g
Agua destilada	1.0 L

### **Preparación**

Disolver los ingredientes en 1.0 L de agua destilada, ajustar el pH si es necesario y distribuir en tubos de ensaye con campanas de Durham. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

**Principio de acción**

Es un medio selectivo para la detección de microorganismos coliformes. La lactosa es la principal fuente de carbono, ésta es hidrolizada por la enzima  $\beta$ -D-galactosidasa presente en las bacterias coliformes, generándose como subproductos glucosa y galactosa que, secuencialmente, son metabolizados hasta ácidos y  $\text{CO}_2$ ; este último se detecta en las campanas de Durham. Debido a que la fermentación se lleva a cabo a 44.5 o 45.5 °C, la prueba positiva indica presencia de *Escherichia coli*.

Alrededor del 97% de las cepas de *E. coli* (incluidas las no productoras de gas) producen la enzima  $\beta$ -D-glucuronidasa (GUD), la cual escinde al sustrato MUG, dando como producto final la 4-metilumbelliferona; este último compuesto es fácilmente detectable cuando se exponen los tubos a una fuente de luz ultravioleta de 365 nm.

La triptosa es la fuente de carbono secundaria y principal fuente de nitrógeno, de aminoácidos esenciales y azufre. Los fosfatos de potasio regulan el pH. El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico y las sales biliares inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas.

**Eosina azul de metileno de Levine, agar (EMB-L)**

Ingredientes	Cantidad
Peptona	10.0 g
Lactosa	10.0 g
Fosfato dibásico de potasio	2.0 g
Eosina Y	0.4 g
Azul de metileno	0.065 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1.0 L
pH	7.1 $\pm$ 0.2

**Preparación**

Disolver la peptona, el fosfato y el agar en un litro de agua, calentar a ebullición hasta la disolución completa. Posteriormente, distribuir en porciones de 100 o 200 mL y esterilizar a no más de 121 °C por 15 minutos; el pH debe ser de 7.1  $\pm$  0.2.

Fundir el medio antes de su uso y adicionar a cada porción de 100 mL:

- a) 5 mL de solución de lactosa al 20%
- b) 2 mL de solución acuosa de eosina al 2%
- c) 4.3 mL de solución acuosa de azul de metileno al 0.15%.

**Nota: cuando se use el producto deshidratado, disolver todos los ingredientes de acuerdo con las instrucciones del fabricante.**

### ***Principio de acción***

El agar eosina azul de metileno es un medio de cultivo selectivo y diferencial. La acción selectiva se debe a la presencia de los colorantes eosina y azul de metileno, los cuales inhiben el crecimiento de las bacterias Gram positivas y Gram negativas exigentes.

El medio es diferencial porque permite distinguir los microorganismos fermentadores de lactosa y productores de una gran cantidad de ácido, de aquellos microorganismos que producen poco ácido, o que no fermentan la lactosa. Las colonias de los microorganismos fermentadores de lactosa productores de gran cantidad de ácido se observan de color verde metálico, esto se debe a la precipitación de un complejo formado por la unión de los colorantes sobre la superficie de las colonias, incluso en la del medio de cultivo, cuando las condiciones son extremadamente ácidas. Por otra parte, las colonias de los microorganismos no fermentadores de lactosa son incoloras. La peptona es la principal fuente de nitrógeno y fuente secundaria de carbono, permite el desarrollo de microorganismos que no son capaces de utilizar la lactosa. El fosfato regula el pH del medio.

**Fraser MEDIA CONCENTRACIÓN, caldo****Medio base**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Peptona de carne (peptona P)	5.0 g
Triptona (tripticasa o digerido pancreático de caseína)	5.0 g
Extracto de carne	5.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Cloruro de sodio	20.0 g
Fosfato de sodio monobásico dihidratado	12.0 g
Fosfato de potasio dibásico	1.35 g
Esculina	1.0 g
Agua	1.0 L

**Preparación**

Disolver los componentes de la base en agua, calentando si es necesario. Ajustar el pH para que, después de la esterilización, se encuentre entre  $7.2 \pm 0.2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Distribuir la base en matraces con capacidad apropiada para la prueba. Esterilizar por 15 min en la autoclave a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Solución de cloruro de litio**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Cloruro de litio	3.0 g
Agua	10.0 mL

**Preparación**

Adicionar el cloruro de litio al agua. Esterilizar por filtración.

Precaución, la disolución de cloruro de litio en agua es fuertemente exotérmica e irritante a las mucosas.

**Solución de ácido nalidíxico**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Sales de ácido nalidíxico sódico	0.1 g
Solución de hidróxido de sodio 0.05 mol/L	10.0 mL

**Preparación**

Disolver las sales de ácido nalidíxico en la solución de hidróxido de sodio. Esterilizar por filtración.

**Solución de clorhidrato de acriflavina**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Clorhidrato de acriflavina	0.25 g
Agua	100.0 mL

**Preparación**

Disolver el clorhidrato de acriflavina en una porción de agua. Esterilizar por filtración.

**Solución de citrato, amonio hierro III**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Citrato de amonio hierro III	5.0 g
Agua	100.0 mL

**Preparación**

Disolver el citrato de amonio hierro III en el agua. Esterilizar por filtración.

**Fraser MEDIA CONCENTRACIÓN medio completo, caldo**  
**Composición total del medio**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Medio base	100.0 mL
Solución de cloruro de litio	1.0 mL
Solución de ácido nalidíxico	0.1 mL
Solución de clorhidrato de acriflavina	0.5 mL
Solución de citrato, amonio hierro III	1.0 mL

***Preparación***

Agregar las cuatro soluciones por cada porción de 100.0 mL de base inmediatamente antes de usar.

***Principio de acción***

Las peptonas, extracto de carne y extracto de levadura proporcionan nitrógeno, vitaminas y minerales. El fosfato de sodio y potasio son los agentes amortiguadores. La diferenciación se ve estimulada por la adición del citrato férrico amoniacal. Debido a que todas las especies de *Listeria* hidrolizan la esculina, la adición de iones hierro al medio detectará la reacción. Un ennegrecimiento del medio por las bacterias que hidrolizan la esculina da como resultado la formación del 6,7-dihidroxicumarina, que reacciona con los iones hierro.

La selectividad es propiciada por la presencia del cloruro de litio, ácido nalidíxico y acriflavina en la fórmula. La alta tolerancia de *Listeria* a la sal se utiliza como medio para inhibir el crecimiento de los enterococos.

**Fraser, caldo**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Triptona (tripticasa o digerido pancreático de caseína)	5.0 g
Peptona de carne (peptona P)	5.0 g
Extracto de carne	5.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Cloruro de sodio	20.0 g
Fosfato de sodio monobásico dihidratado	12.0 g
Fosfato de potasio dibásico	1.35 g
Esculina	1.0 g
Cloruro de litio	3.0 g
Sal de sodio o ácido nalidíxico	0.02 g
Agua	1.0 L

**Preparación**

Disolver los componentes de la base en agua, calentar si es necesario. Ajustar el pH para que, después de la esterilización, se encuentre entre  $7.2 \pm 0.2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Distribuir la base en matraces con capacidad apropiada para la prueba. Esterilizar por 15 min en la autoclave a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Solución de clorhidrato de acriflavina**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Clorhidrato de acriflavina	0.25 g
Agua destilada	100.0 mL

**Preparación**

Disolver el clorhidrato de acriflavina en una porción de agua. Esterilizar por filtración.

**Solución de citrato, amonio hierro III**

Ingredientes	Cantidad
Citrato de amonio hierro III	5.0 g
Agua destilada	100.0 mL

**Preparación**

Disolver el citrato de amonio hierro III en el agua. Esterilizar por filtración.

**Fraser, CONCENTRACIÓN COMPLETA medio completo, caldo**  
**Composición total del medio**
**Preparación**

Antes de usar, añadir a cada tubo con 10.0 mL del medio base, 0.1 mL de las soluciones de clorhidrato de acriflavina y de citrato de amonio hierro III. Mezclar vigorosamente.

 **$\beta$ -galactosidasa, enzima; discos para detección de la (discos ONPG)****Principio de acción**

Las bacterias que causan una acidificación rápida de la lactosa poseen dos enzimas: una capaz de permitir la entrada de la lactosa dentro de la célula (permeasa  $\beta$ -galactosidasa) y la enzima que hidroliza la molécula de la lactosa en glucosa y galactosa ( $\beta$ -galactosidasa). Si el primer sistema enzimático está ausente (p. ej. *V. cholerae*, vibrios no aglutinables, *Aeromonas* sp., etc.), una bacteria potencialmente lactosa positiva que posea la  $\beta$ -galactosidasa será incapaz de expresar esta característica y aparecerá como lactosa negativa. Por lo tanto, un método rápido para detectar este tipo de bacterias es a través de un método simple como discos de ONPG. Una solución de ortonitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (abreviatura ONPG) es incolora. Por la acción de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, esta molécula se hidroliza, de igual forma que la lactosa, con la liberación del ortonitrofenil, el cual tiene un color amarillo en solución.

## ANEXO I

Esta prueba se lleva en un medio que incluya un *buffer*. Los discos contienen ONPG y un *buffer*.

### Gelatina, agar/medio (GA)

Ingredientes	Cantidad
Triptona (tripticasa o digerido pancreático de caseína)	10.0 g
Cloruro de sodio	10.0 g
Gelatina	30.0 g
Agar*	15.0 g
Agua destilada	1.0 L

\* El medio gelatina carece de este ingrediente.

### Gelatina con 3% NaCl, agar/medio (GS)

Ingredientes	Cantidad
Triptona (tripticasa o digerido pancreático de caseína)	10.0 g
Cloruro de sodio	30.0 g
Gelatina	30.0 g
Agar**	15.0 g
Agua destilada	1.0 L

\*\* El medio gelatina con 3% de NaCl carece de este ingrediente.

### Preparación

Suspender los ingredientes y hervir hasta la disolución de la gelatina y el agar; ajustar el pH a  $7.2 \pm 0.2$ . Esterilizar en autoclave 15 minutos a  $121^\circ\text{C}$ . Enfriar de  $45\text{-}50^\circ\text{C}$  y distribuir en cajas de Petri estériles. Para preparar caldo GS, omitir el agar.

**Principio de acción**

El agar gelatina con sal se emplea para evaluar la tolerancia a la sal. Las especies de *Vibrio* halófilas o halotolerantes desarrollan en este medio, además se recomienda inocularlas en el agar gelatina. Un halo opaco se observa alrededor del desarrollo de los microorganismos gelatinasa positivos. La triptona y el extracto de levadura proporcionan nutrientes esenciales para el desarrollo de las especies de *Vibrio*. La gelatina funciona como sustrato para la prueba de la gelatina, en caso de realizarse en placas, se observa un halo alrededor de la colonia.

En caso de realizarse en tubos de ensaye con medio gelatina (con o sin NaCl), posterior a la inoculación e incubación, se deberán refrigerar los tubos por 10 min, la carencia en el poder gelificante (consistencia gelatinosa) se considera como un microorganismo proteolítico por presencia de la gelatinasa.

El cloruro de sodio funciona como osmoregulador, o bien, como agente selectivo para microorganismos halófilos o halotolerantes. Si se desea inhibir la diseminación de *Vibrio* sp., así como *V. alginolyticus*, usar de 25.0-30.0 g de agar por litro.

**Hierro Kligler, agar (KIA)**

Ingredientes	Cantidad
Peptona polipeptona	20.0 g
Lactosa	20.0 g
Dextrosa	1.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Citrato férrico amoniacal	0.5 g
Tiosulfato de sodio	0.5 g
Rojo de fenol	0.025 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1.0 L

**Preparación**

Se sugiere añadir 20.0 g de NaCl/L de medio de cultivo para identificar *Vibrio* sp. o *V. cholerae*. Para cualquier otro microorganismo considerar la formulación indicada en el cuadro.

Suspender los ingredientes y hervir hasta la disolución del agar. Distribuir en tubos de tapón de rosca. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C. Dejar solidificar los tubos inclinados. Ajustar el pH de  $7.4 \pm 0.2$ .

### ***Principio de acción***

El medio se solidifica en forma inclinada, permitiendo tener dos cámaras de crecimiento: una aeróbica, el pico de flauta, y la otra anaeróbica, el fondo del tubo. La degradación de los carbohidratos acompañada de producción de ácido se detecta mediante el indicador de pH rojo de fenol, el cual cambia su color de rojo-naranja a amarillo; bajo alcalinización se torna rojo intenso. El tiosulfato es reducido por muchas especies bacterianas a ácido sulfhídrico, el cual reacciona con la sal de hierro para dar un sulfuro ferroso de color negro.

Fermentación de carbohidratos: la fermentación de glucosa cambia el medio a amarillo, pero debido a su baja concentración (0.1%) esto sólo se observa en el fondo del tubo, mientras que la superficie cambia a rojo. Una vez consumida la glucosa, el microorganismo comienza a metabolizar aminoácidos liberando amoníaco, lo cual alcaliniza el medio, esto ocurre en la superficie.

La fermentación de lactosa cambia el medio a amarillo y dado que su concentración es mayor (1%), la formación de ácido es suficiente para mantener el color amarillo, tanto en el fondo como en la superficie del tubo. En caso de no haber fermentación, el medio vira a rojo.

La inoculación se realiza por picadura en el agar y estría cerrada en la superficie inclinada. Se incuba a  $35 \pm 2$  °C durante 18 a 24 horas en condiciones aerobias.

**Hierro y Lisina, agar (LIA)**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Peptona o gelisato	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Glucosa	1.0 g
L-lisina	10.0 g
Citrato férrico amónico	0.5 g
Tiosulfato de sodio	0.04 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1.0 L

**Preparación**

Se sugiere añadir 20.0 g de NaCl/L de medio de cultivo para identificar *Vibrio* sp. o *V. cholerae*. En caso contrario, respetar la formulación indicada.

Disolver los ingredientes en el agua destilada y mezclar bien; calentar hasta ebullición con agitación frecuente para conseguir la disolución completa. Esterilizar en autoclave 12 minutos a 121 °C. Enfriar de 50-60 °C y ajustar el pH de  $6.7 \pm 0.1$ . Distribuir en volúmenes de 3 mL. Enfriar los tubos en posición inclinada, de tal modo que se obtengan columnas de medio de 3 cm y una parte inclinada de 2 cm.

**Principio de acción**

La descarboxilación del aminoácido lisina por microorganismos descarboxilasa positivos libera la amina cadaverina, la cual provoca que el indicador de pH púrpura de bromocresol cambie su color a violeta. Debido a que la descarboxilación sólo ocurre en medio ácido (por debajo de pH 6.0), el medio debe acidificarse mediante la fermentación de la glucosa. Este medio, por lo tanto, puede utilizarse para la diferenciación de microorganismos fermentadores de la glucosa.

Los microorganismos descarboxilasa negativos, fermentadores de glucosa, provocan que el medio por completo vire a amarillo. En periodos de incubación prolongados, se puede presentar alcalinización de la superficie del medio, dando por

consecuencia un cambio en el color al violeta. La producción de H<sub>2</sub>S provoca un ennegrecimiento del medio de cultivo, debido a la formación de sulfuro ferroso.

Algunas especies de *Proteus-Providencia*, con excepción de *P. morganii*, desaminan la lisina para proporcionar ácido α-cetocarboxílico, este compuesto reacciona con la sal de hierro cercana a la superficie del medio, bajo la influencia del oxígeno, para formar compuestos café-rojizos.

### Hugh-Leifson con glucosa, medio

Ingredientes	Cantidad
Peptona	2.0 g
Extracto de levadura	0.5 g
Cloruro de sodio	20.0 g
Dextrosa	10.0 g
Púrpura de bromocresol	0.015 g
Agar	3.0 g
Agua destilada	1.0 L

### Preparación

Se sugiere añadir 20.0 g de NaCl/L de medio de cultivo para identificar *Vibrio* sp. o *V. cholerae*. En caso contrario, respetar la formulación indicada.

Suspender los ingredientes y hervir hasta disolver el agar. Ajustar el pH a  $7.4 \pm 0.2$ . Colocar en tubos y esterilizar en autoclave 15 minutos a 121 °C.

### Principio de acción

Al añadir un carbohidrato al medio de cultivo, la degradación del carbohidrato con la consecuente liberación de ácido se hace evidente por el indicador de pH azul de bromotimol, el cual cambia su color a amarillo. La degradación se lleva a cabo mientras el medio está expuesto al aire (la degradación puede ser oxidativa o fermentativa) o en ausencia del aire (degradación fermentativa, solamente).

Para cada carbohidrato, inocular un tubo con un cultivo puro del microorganismo mediante picadura hasta el fondo de los tubos y sellar un tubo con parafina y otro

no. El microorganismo utilizado para la inoculación deberá estar en fase logarítmica de desarrollo. Incubar al menos 48 h a temperatura óptima de incubación.

Una coloración amarilla en ambos tubos, uno abierto y otro sellado con parafina (o aceite mineral), significa degradación fermentativa, mientras que una coloración amarilla sólo del tubo abierto indica que el carbohidrato en cuestión es degradado solamente vía oxidativa. La degradación oxidativa se presenta sólo o cerca-namente a la superficie del medio; mientras que la degradación fermentativa se presenta en la superficie y en todo el tubo. Se comprueban el crecimiento microbiano producido mediante la observación de turbidez solamente a lo largo de la línea de la picadura (cepa no móvil) o a lo largo de todo el medio (cepa móvil).

### **Kligler-Hierro, agar (KIA; ver Hierro Kligler, agar)**

#### **Lauril sulfato triptosa, caldo**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Bacto triptosa	20.0 g
Bacto lactosa	5.0 g
Fosfato potásico dibásico	2.75 g
Fosfato potásico monobásico	2.75 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Lauril sulfato de sodio	0.1 g
Agua destilada	1.0 L

#### ***Preparación***

Disolver los ingredientes en 1.0 L de agua destilada, ajustar el pH si es necesario y distribuir en tubos de ensaye 22 mm x 175 mm con campanas de Durham. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

#### ***Principio de acción***

Medio selectivo para la detección de microorganismos coliformes empleado en la fase presuntiva, cuyo objetivo es restablecer del daño celular al que son sometidos los coliformes durante los procesos de elaboración de los alimentos o

bebidas, a la vez que permite una detección preliminar del grupo microbiano. La lactosa es la principal fuente de carbono; ésta es hidrolizada por la enzima  $\beta$ -D-galactosidasa presente en las bacterias coliformes, generando glucosa y galactosa, las que son metabolizadas hasta ácido y  $\text{CO}_2$ , el cual queda atrapado en las campanas de fermentación. La triptosa es la fuente de carbono secundaria y principal fuente de nitrógeno, de aminoácidos esenciales y azufre. Los fosfatos de potasio actúan como amortiguador de pH, el cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico y el lauril sulfato de sodio es el inhibidor de microorganismos que no sean coliformes.

### L-Lisina descarboxilasa, caldo

Ingredientes	Cantidad
Peptona hidrolizada de tejido animal	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Glucosa	1.0 g
L-Lisina (hidrocloruro)	5.0 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agua	1.0 L

### Preparación

Disolver 14.02 g en 1.0 L de agua destilada. Calentar si es necesario para disolver el medio completamente. Distribuir 5.0 mL en tubos con tapón de rosca. Esterilizar a 121 °C durante 15 min. El pH después de esterilizar deberá estar a  $6.8 \pm 0.2$ . Posterior a la inoculación, se deberá agregar una sobrecapa de aceite mineral estéril.

### Principio de acción

El caldo L-lisina descarboxilasa se emplea para diferenciar *Salmonella Arizonae*, así como otros miembros de las enterobacterias distintos a *Klebsiella* y *Enterobacter*. Durante las primeras horas de incubación, la fermentación inicial de la glucosa genera ambiente ácido. La condición ácida genera un vire o cambio del indicador de pH, púrpura de bromocresol a amarillo. Esta condición ácida

estimula la actividad de la lisin-d Descarboxilasa, que produce la descarboxilación de la lisina a cadaverina. Las condiciones alcalinas generadas por la producción de la cadaverina ocasionan que el indicador púrpura de bromocresol (virado a amarillo) revierta a color púrpura. Si los organismos no producen la lisin-d Descarboxilasa, el color del medio permanece amarillo. Los microorganismos que no emplean la glucosa no generarán ningún cambio en el color del medio. Se debe emplear un inóculo ligero y no incubar más de 24 h. Sin embargo, algunos organismos requieren hasta 4 días de incubación.

### **Lisina Hierro, agar (ver Hierro lisina, agar)**

#### **Mueller-Kauffman-Tetrionato-Novobiocina (MKTTn), caldo**

##### **Medio base**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Extracto de carne	4.3 g
Digerido enzimático de caseína	8.6 g
NaCl	2.6 g
CaCO <sub>3</sub>	38.7 g
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> *5H <sub>2</sub> O	47.8 g
Ox sales biliares uso bacteriológico	4.78 g
Verde brillante	0.096 g
Agua destilada	1.0 L

#### **Preparación**

Disolver los ingredientes deshidratados básicos de la fórmula o el medio completo deshidratado en el agua. Hervir por 5 min. Ajustar el pH, si es necesario, a  $8.2 \pm 0.2$  a 25 °C. El medio base puede almacenarse por 4 semanas a  $3 \pm 2$  °C.

**Solución de yodo-yoduro**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Yodo	20.0 g
Yoduro de potasio (KI)	25.0 g
Agua destilada	100 mL

**Preparación**

Disolver completamente el yoduro de potasio en 10 mL de agua, agregar el yodo y diluir a 100 mL con agua estéril. No calentar. Almacenar la solución en la oscuridad a temperatura ambiente en un frasco bien cerrado.

**Solución de novobiocina**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Novobiocina (sal sódica)	0.04 g
Agua destilada	5.0 mL

**Preparación**

Disolver la novobiocina (sal sódica) en el agua y esterilizar por filtración. Se puede almacenar la solución por no más de 4 semanas a  $3 \pm 2$  °C.

**Medio completo**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Medio base	1.0 L
Solución de yodo-yoduro	20.0 mL
Solución de novobiocina	5.0 mL

**Preparación**

Agregar asépticamente 5.0 mL de solución de novobiocina a 1 000 mL de medio base. Mezclar, después agregar 20.0 mL de la solución de yodo-yoduro. Mezclar bien, distribuir el medio asépticamente en recipientes estériles de suficiente capacidad para contener las porciones necesarias de prueba. El medio completo debe utilizarse el mismo día de la preparación.

**Principio de acción**

Al mezclar el tiosulfato de sodio con la solución de yodo-yoduro se generan sales de tetrionato. Estas sales, así como la novobiocina, inhiben bacterias Gram positivas y especies del género *Proteus* sp. Las sales biliares inhiben microbiota no entérica. El verde brillante inhibe el desarrollo de los microorganismos Gram positivos. Este medio se emplea en el enriquecimiento selectivo de *Salmonella* spp.

**Movilidad, agar de (sin inclinar)**

Ingredientes	Cantidad
Peptona de caseína	20.0 g
Peptona de carne	6.1 g
Agar	3.5
Agua	1.0 L

Disolver los componentes en agua hirviendo. Ajustar el pH, si es necesario, a modo que después de la esterilización sea de  $7.3 \pm 0.2$  a 25 °C. Verter el medio en tubos en cantidades de 5.0 mL y esterilizar por 15 min en autoclave a 121 °C.

**Principio de acción**

El presente medio pone de manifiesto si el microorganismo es móvil, esto es, que presente flagelos, lo cual se observa si después de incubar existe desarrollo más allá de donde pasó el asa microbiológica al inocular al medio.

**Oxford, agar (OXA)****Medio base**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Base de agar Columbia La fórmula aproximada de la base agar Columbia contiene: digerido pancreático de caseína (proteosa peptona) 23.0 g, almidón 1.0 g, cloruro de sodio 5.0 g, agar 9.0 a 18.0 g	39.0 g
Esculina	1.0 g
Citrato de amonio, hierro III	0.5 g
Cloruro de litio	15.0 g
Agua	1.0 L

**Preparación**

Agregar los ingredientes a un litro de agua hirviendo. Ajustar el pH si es necesario, para que después de la esterilización el pH se ubique entre  $7.2 \pm 0.2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, esterilizar en autoclave a  $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Enfriar el medio base a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  y, en condiciones asépticas, incorporar los siguientes suplementos:

**Un litro de medio Oxford debe contener los siguientes  
suplementos:**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Cicloheximida	400.0 mg
Sulfato de colistina	20.0 mg
Acriflavina	5.0 mg
Cefotetán	2.0 mg
Fosfomicina	10.0 mg

**Preparación**

Disolver la cicloheximida, el sulfato de colestina, acriflavina, cefotetán y la fosfomicina en 10 mL de una mezcla 1:1 de etanol:agua. Esterilizar por filtración antes de agregar al medio base. Mezclar y vaciar en cajas de Petri estériles.

Las placas del medio Oxford se deben almacenar en oscuridad, evitando el contacto con la luz y como máximo almacenar hasta dos semanas.

**Principio de acción**

La microbiota acompañante indeseable se inhibe con el cloruro de litio, acriflavina, sulfato de colistina, cefotetán, cicloheximida y fosfomicina. *L. monocytogenes* degrada la esculina presente en el medio de cultivo, dando esculentina, con formación de hierro (III), que producen compuestos complejos negros, que luego tiñen de negro las colonias de *L. monocytogenes*.

**Palcam, agar****Medio base**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Peptonas	23.0 g
Almidón	1.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Agar	9.0 a 18.0 g
D-glucosa	0.5 g
D-manitol	10.0 g
Esculina	0.8 a 1.0 g
Citrato de amonio, hierro III	0.5 g
Rojo de fenol	0.08 g
Cloruro de litio	15.0 g
Agua	960 mL

**Preparación**

Agregar los ingredientes a un litro de agua, calentando si es necesario. Ajustar el pH para que, después de la esterilización, se encuentre entre  $7.2 \pm 0.2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, esterilizar en autoclave a  $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. A 960 mL de la base PALCAM, enfriada a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  en condiciones asépticas, agregar los siguientes suplementos para preparar el medio completo agar PALCAM.

**Composición total del medio**

Ingredientes	Cantidad
Medio base para Palcam	960.0 mL
Solución de sulfato de polimixina B	10.0 mL
Solución de clorhidrato de acriflavina	10.0 mL
Solución de ceftazidima sódica pentahidratada	20.0 mL

**Principio de acción**

La microbiota acompañante indeseable se inhibe con el cloruro de litio, sulfato de polimixina B y el clorhidrato de acriflavina; que junto con el agente ceftazidima suprimen efectivamente el desarrollo de las bacterias que con mayor frecuencia se encuentran en los alimentos que no son *Listeria spp.* *L. monocytogenes* hidroliza la esculina presente en el medio de cultivo, dando esculentina, con formación de hierro (III), que producen compuestos complejos negros, que luego tiñen de negro las colonias. El manitol y el indicador de pH, rojo de fenol, se han añadido para diferenciar las bacterias que logran fermentar este carbohidrato y la demostración es a través del cambio de color en la colonia y/o en el medio que la rodea de rojo a amarillo, debido a los productos finales de carácter ácido.

**Papa dextrosa, agar**

Ingredientes	Cantidad
Infusión de papa	200.0 g
Dextrosa	20.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1.0 L

**Preparación**

Suspender los ingredientes en el agua destilada, permitiendo la humectación de los polvos, para evitar la formación de grumos. Calentar el medio hasta ebullición y, finalmente, esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Para utilizarlo, enfriar el medio de cultivo en baño de agua hasta  $45 \pm 1$  °C y acidificar a un pH de  $3.5 \pm 0.1$ , con ácido tartárico. Después de adicionar el ácido tartárico al medio de cultivo, verter rápidamente en las cajas ya inoculadas; no se debe recalentar, pues el ácido provocaría la hidrólisis del agar.

**Principio de acción**

Los hidratos de carbono contenidos en la infusión de papa favorecen el crecimiento de hongos y levaduras; el pH ácido confiere selectividad al medio inhibiendo a las bacterias y permite que los hongos y levaduras crezcan.

**Peptonada alcalina, agua (APA)**

Ingredientes	Cantidad
Peptona	10.0 g
Cloruro de sodio	10.0 g
Agua destilada	1.0 L

**Preparación**

Disolver los ingredientes. Ajustar el pH de tal forma que después de esterilizar éste sea de  $8.5 \pm 0.2$ . Esterilizar en autoclave 10 minutos a 121 °C.

**Principio de acción**

El agua peptonada alcalina se emplea para el enriquecimiento de *Vibrio cholerae* y especies de *Vibrio* sp. a partir de alimentos, agua y muestras clínicas. Este caldo puede emplearse para la examinación microscópica de las muestras empleando el método de la gota pendiente.

Tanto el cloruro de sodio como el medio alcalino favorecen el desarrollo de *V. cholerae*.

### Rojo de fenol, caldo

Ingredientes	Cantidad
Peptona de caseína	10.0 g
Extracto de carne	1.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Rojo de fenol	0.018 g
Carbohidrato fermentable*	10.0 g
Agua destilada	1.0 L
pH	7.4 ± 0.2

\*El carbohidrato fermentable puede ser lactosa, manitol, glucosa, etc. y éstos se agregan normalmente en una proporción del 1%.

### Preparación

Se sugiere añadir 20.0 g de NaCl/L de medio de cultivo para identificar *Vibrio* sp. o *V. cholerae*. En caso contrario, respetar la formulación indicada.

Pesar con precisión la cantidad descrita en el envase. Rehidratar con el agua destilada. Calentar suavemente la solución. El carbohidrato se puede agregar antes de la esterilización. Ajustar el pH del medio antes de esterilizar. Acondicionar en los tubos correspondientes. Esterilizar 116-118 °C durante 15 min. Conservar en refrigeración (4-10 °C). La caducidad es aproximadamente de 6-8 semanas. Se inocula a partir de un cultivo puro (agar Kligler hierro u otro medio adecuado) de 18 a 24 horas de incubación.

### Principio de acción

Se determina la capacidad de un microorganismo para fermentar (degradar) un carbohidrato específico en un medio basal y producir ácido o ácido con gas visible. La fermentación es un proceso anaerobio de oxidación-reducción, en el

cual un sustrato orgánico actúa como el aceptor final de electrones. Los productos característicos de la fermentación bacteriana son: a) ácido láctico, b) ácidos acético y fórmico, c) ácido láctico y alcohol etílico, d) etanol, e) acetilmetilcarbinol y CO<sub>2</sub>, f) ácido succínico a ácido propiónico y CO<sub>2</sub>, g) CO<sub>2</sub> y acetona a alcohol isopropílico y h) ácido butírico a alcohol butílico. El indicador de pH utilizado para demostrar la fermentación del hidrato de carbono es el rojo de fenol, ya que la mayoría de los productos finales del metabolismo de carbohidratos son ácidos y generarán un vire del indicador a amarillo.

**Rojo de Metilo-Voges Proskauer, caldo (RM-VP;  
prueba de Rojo de Metilo y Voges Proskauer)**

Ingredientes	Cantidad
Pluripeptona	7.0 g
Glucosa	5.0 g
Fosfato monobásico de potasio	5.0 g
Agua destilada	1.0 L
pH	6.9 ± 0.2

**Preparación**

Se sugiere añadir 20.0 g de NaCl/L de medio de cultivo para identificar *Vibrio* sp. o *V. cholerae*. En caso contrario, respetar la formulación indicada.

Disolver los ingredientes en 1 L de agua destilada. Agitar constantemente para ayudar a la disolución, ajustar el pH si es necesario. Distribuir en tubos de ensaye. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

**Principio de acción**

La glucosa es el principal sustrato utilizado por los microorganismos para la obtención de energía. Los productos finales de la oxidación de la glucosa varían dependiendo de la ruta metabólica y de las enzimas presentes en la bacteria. Por lo tanto, se describen a continuación dos vías:

### Prueba de rojo de metilo

La prueba de rojo de metilo se lleva a cabo para determinar la capacidad de un microorganismo de producir y mantener estables los ácidos orgánicos generados por la fermentación de la glucosa. El indicador de pH rojo de metilo a pH de 4.4 tiene un color rojo y a pH de 6.0 o superior su color es amarillo. Aunque todos los microorganismos entéricos fermentan la glucosa y producen ácidos orgánicos, esta prueba se emplea para diferenciar *Escherichia coli* de *Enterobacter aerogenes*.

Estos microorganismos en las primeras horas de incubación producen ácidos orgánicos. Sin embargo, *Escherichia coli* es capaz de estabilizar y mantener el pH ácido (4.0-4.4) hasta finalizar el periodo de incubación (24-48 h) debido a que produce más ácidos, por lo que vence el sistema amortiguador. Por su parte, *Enterobacter aerogenes* es capaz de convertir estos ácidos en productos neutros como etanol y acetilmetilcarbinol (acetoína), por lo que el pH se eleva aproximadamente a 6.0.

### Prueba de Voges-Proskauer

Esta prueba determina la capacidad de algunos microorganismos de generar, como productos finales del metabolismo de la glucosa, compuestos neutros como el acetilmetilcarbinol (acetoína).

La glucosa es metabolizada por algunas bacterias hasta ácido pirúvico, la descarboxilación de dos moléculas de este ácido producen la acetoína, que es un precursor del 2,3-butanodiol. Tanto la acetoína como el 2,3-butanodiol son compuestos neutros.

En presencia de oxígeno atmosférico y un álcali, la acetoína como el 2,3-butanodiol reaccionan con el alfa-naftol, generando diacetilo, este compuesto se condensa con la guanidina presente en el medio de cultivo, generando un compuesto de color rojo (prueba positiva) en un tiempo aproximado de 15 minutos.

Si la acetoína no está presente, los reactivos no cambian de color (prueba negativa).

La pluripeptona es la fuente de carbono secundaria y principal precursor de nitrógeno, aminoácidos esenciales y azufre. El fosfato es el regulador de pH.

**Púrpura de bromocresol con carbohidratos  
(Ramnosa o Xilosa), caldo**

Ingredientes	Cantidad
Proteosa peptona No. 3	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Extracto de carne	1.0 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agua destilada	1.0 L

***Preparación***

Calentar si es necesario para disolver los ingredientes. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a  $121 \pm 1$  °C. El pH final debe ser de  $6.8 \pm 0.2$ . Posteriormente, agregar la solución del carbohidrato que se desee, previamente esterilizada por filtración, para obtener una concentración final del 0.5%.

***Principio de acción***

Este medio sirve para observar la fermentación de azúcares (L-Ramnosa o D-Xilosa) con producción de acidez. El vire del indicador va de tonalidades púrpuras a tonalidades amarillas en caso de producción de acidez.

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

**Rappaport-Vassiliadis-Peptona de soya, caldo (RVS)**

**Solución A**

Ingredientes	Cantidad
Digerido enzimático de soya	5.0 g
NaCl	8.0 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.4 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.2 g
Agua destilada	1.0 L

**Preparación**

Preparar por ingredientes y disolverlos en el agua. Es necesario aproximadamente a 70 °C. La solución debe prepararse el día de la preparación de medio RVS completo.

**Solución B**

Ingredientes	Cantidad
MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	400.0 g
Agua destilada	1.0 L

**Preparación**

Disolver el cloruro de magnesio en el agua. Como esta sal es muy higroscópica, es aconsejable disolver el contenido completo de un frasco nuevo del reactivo de acuerdo con la fórmula. Por ejemplo, 250 g de cloruro de magnesio a 625 mL de agua dará un volumen de 788 mL y una concentración de 31.7 g por cada 100 mL de cloruro de magnesio aproximadamente. La solución puede almacenarse en un frasco ámbar con tapa hermética a temperatura ambiente por 2 años.

**Solución C**

Ingredientes	Cantidad
Oxalato de verde de malaquita	0.4 g
Agua destilada	100 mL

**Preparación**

Disolver el oxalato de verde de malaquita en el agua. La solución puede almacenarse en frasco ámbar a temperatura ambiente por 8 meses.

**Medio completo**

Ingredientes	Cantidad
Solución A	1000 mL
Solución B	100 mL
Solución C	10 mL

**Preparación**

Agregar 1 000 mL de la solución A, 100 mL de la solución B y 10 mL de la solución C. Ajustar el pH si es necesario, de tal manera que después de la esterilización sea de  $5.2 \pm 0.2$ . Antes de su uso, distribuir en porciones de 10 mL en cada tubo. Esterilizar a  $115\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 min. Almacenar el medio preparado a  $3 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Utilizar el medio el mismo día de su preparación.

**NOTA:** la composición final del medio completo será de digerido enzimático de soya 4.5 g/L; NaCl 7.2 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.44 g/L;  $\text{MgCl}_2$  13.4 g/L o  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  28.6 g/L; oxalato de verde de malaquita 0.036 g/L.

**Salmonella-Shigella, agar (SS)**

Ingredientes	Cantidad
Extracto de carne	5.0 g
Polipeptona	5.0 g
Lactosa	10.0 g
Sales biliares	8.5 g
Citrato de sodio deshidratado	8.5 g
Tiosulfato de sodio pentahidratado	8.5 g
Citrato férrico	1.0 g
Agar	13.5 g
Rojo neutro	0.025 g
Verde brillante	0.330 mg
Agua destilada	1.0 L

**Preparación**

Suspender los ingredientes en agua destilada estéril y calentar hasta disolución completa. Ajustar el pH a  $7.0 \pm 0.2$ . No esterilizar en autoclave. Enfriar a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  y distribuir en cajas de Petri estériles en condiciones asépticas. El aspecto del medio fundido es claro y de color rosado.

**Principio de acción**

El agar SS es un medio selectivo diferencial para el aislamiento de especies de *Salmonella* y *Shigella* a partir de muestras patológicas, alimentos contaminados, etc. Los organismos coliformes, Gram negativos y la microbiota acompañante son inhibidos por los componentes inhibitorios como el verde brillante, sales biliares. El tiosulfato en combinación con el hierro actúa como indicadores de la producción de ácido sulfhídrico, lo cual se evidencia por el oscurecimiento en el centro de las colonias. Las colonias de coliformes quedan señaladas por la demostración de la degradación de la lactosa a ácido, a cargo del indicador de pH rojo neutro, de tal forma que las colonias de microorganismos lactosa-negativos son incoloras, y las de microorganismos lactosa-positivos son rosadas, hasta rojas.

**Sangre de cordero al 5%, agar**

Ingredientes	Cantidad
Base de agar sangre	95.0 mL
Sangre de cordero al 5% desfibrinada	5.0 mL

**Preparación**

Preparar el agar base de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Enfriar a  $45 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  y agregar asépticamente la sangre de carnero, la cual previamente se debe encontrar a temperatura ambiente ( $20\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Homogeneizar el medio y verter en las cajas de Petri estériles de 12.0 a 15.0 mL para la prueba de CAMP y de 15.0 a 20.0 mL para la prueba de hemólisis.

**Principio de acción**

Este medio detecta a los microorganismos que pueden lisar los eritrocitos, pudiendo diferenciar las hemólisis alfa o beta.

**Soya tripticaseína con 0.6% de extracto de levadura,  
agar (ASTEL) (Listeria)**

Ingredientes	Cantidad
Caldo triptona soya La fórmula aproximada del caldo triptona soya contiene: triptona (tripticasa o digerido pancreático de caseína) 17.0 g, peptona de soya (fitona o soytona) 3.0 g, cloruro de sodio 5.0 g, fosfato dipotásico 2.5 g y glucosa 2.5 g	30.0 g
Extracto de levadura	6.0 g
Agar	9.0 a 18.0 g
Agua	1.0 L

**Preparación**

Agitar y calentar a ebullición hasta disolver el agar. Esterilizar a  $121 \pm 1$  °C durante 15 minutos, el pH final será de  $7.3 \pm 0.2$ .

**Soya tripticaseína con 0.6% de extracto de levadura,  
caldo (CSTEL) (Listeria)**

Ingredientes	Cantidad
Caldo triptona soya La fórmula aproximada del caldo triptona soya contiene: triptona (tripticasa o digerido pancreático de caseína) 17.0 g, peptona de soya (fitona o soytona) 3.0 g, cloruro de sodio 5.0 g, fosfato dipotásico 2.5 g y glucosa 2.5 g	30.0 g
Extracto de levadura	6.0 g
Agua	1.0 L

**Preparación**

Agitar hasta disolver los ingredientes. Esterilizar a  $121 \pm 1$  °C durante 15 minutos. El pH final de la solución debe ser  $7.3 \pm 0.2$ .

**Principio de acción (ASTEL y CSTEL)**

Medios de cultivo enriquecidos empleados para el óptimo desarrollo de *Listeria monocytogenes*; el extracto de levadura que contienen proporciona factores de crecimiento para un desarrollo óptimo de dicho microorganismo. El agar ASTEL se emplea para la purificación de *L. monocytogenes* a partir de los medios selectivos Oxford y/o PALCAM, ya que en estos medios las colonias del microorganismo pueden estar aún contaminadas con microbiota competitiva parcialmente inhibida. El medio CSTEL se emplea para evaluar la movilidad tipo *tumbling* del microorganismo con una preparación microscópica en fresco, y ser incubados a 25 °C durante 24 h.

**Sulfito de bismuto, agar (ASB)**

Ingredientes	Cantidad
Extracto de carne de res	5.0 g
Mezcla de peptonas	10.0 g
Glucosa	5.0 g
Fosfato sódico dibásico (anhidro)	5.0 g
Sulfato ferroso (anhidro)	0.3 g
Sulfito de bismuto	8.0 g
Verde brillante	0.025 g
Agar	20.0 g
Agua destilada	1.0 L

**Preparación**

Suspender todos los ingredientes en el agua destilada. Calentar hasta su disolución completa, agitando frecuentemente. Ajustar el pH a  $7.6 \pm 0.2$ . Enfriar a 45 °C y

verter en cajas de Petri estériles, distribuyendo de manera homogénea el precipitado propio del medio. El aspecto de las placas es opaco, de color verde pálido y deben usarse el mismo día de su preparación. Si la coloración es parda, no deben utilizarse. El medio no debe esterilizarse en autoclave; el sobrecalentamiento afecta su selectividad.

### **Principio de acción**

En este medio, el sulfito de bismuto actúa con el verde brillante como agente selectivo para la inhibición de coliformes, permitiendo el desarrollo de *Salmonella*. Los compuestos de azufre funcionan como sustrato para la producción de ácido sulfhídrico, mientras que la reducción de las sales de bismuto a bismuto metálico tiñe las colonias de un brillo negro o café metálico por la reducción del sulfito a sulfuro, produciendo ácido sulfhídrico.

### **Tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa, agar (TCBS)**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Peptona de caseína	5.0 g
Peptona de carne	5.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Sacarosa	20.0 g
Tiosulfato de sodio*H <sub>2</sub> O	10.0 g
Colato de sodio	3.0 g
Bilis de buey	5.0 g
Cloruro de sodio	10.0 g
Citrato férrico	1.0 g
Azul de bromotimol	40.0 mg
Azul de timol	40.0 mg
Agar	15.0 g
Agua destilada	1.0 L

**Preparación**

Utilizar un matraz por lo menos tres veces más grande que el volumen requerido de medio. Adicionar los ingredientes en agua destilada tibia y calentar con agitación constante hasta ebullición e inmediatamente retirar del calor. No esterilizar, pH  $8.6 \pm 0.2$  a 25 °C, enfriar a 50 °C y colocar en cajas de Petri. Dejar secar las placas de 37-45 °C antes de usar.

**Principio de acción**

La alta concentración del tiosulfato y citrato, así como la fuerte alcalinidad de este medio, inhibe el crecimiento de la familia *Enterobacteriaceae*. Las sales biliares y el colato suprimen principalmente a los enterococos. Cualquier bacteria coliforme que pudiera crecer no puede metabolizar la sacarosa. Solamente unas cuantas especies de *Proteus* sacarosa-positiva pueden crecer para formar colonias amarillas, parecidas a los vibrios. La mezcla de indicadores azul de timo-azul de bromotimol cambia su color a amarillo, cuando hay liberación de ácido, aún en este medio fuertemente alcalino.

Incubar de 18-24 h a 35 °C aeróbicamente.

<b>Apariencia de las colonias</b>	<b>Microorganismos</b>
Amarillas y planas, 2-3 mm de diámetro	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio cholerae</i> var. El Tor
Pequeñas, centro azul-verde	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Grandes, amarillas	<i>Vibrio alginolyticus</i>
Azul	<i>Pseudomonas</i> , <i>Aeromonas</i> y otros
Muy pequeñas, transparentes	<i>Enterobacteriaceae</i> y otros

**Triple Azúcar y Hierro, agar (TSI)**

Ingredientes	Cantidad
Polipeptona	20.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Lactosa	10.0 g
Sacarosa	10.0 g
Glucosa	1.0 g
Sulfato ferroso amónico	0.2 g
Tiosulfato de sodio	0.2 g
Rojo de fenol	0.025 g
Agar	13.0 g
Agua destilada	1.0 L

**Preparación**

Se sugiere añadir 20.0 g de NaCl/L de medio de cultivo para identificar *Vibrio* sp. o *V. cholerae*; de lo contrario, utilizar la formulación indicada.

Disolver los ingredientes en agua destilada. Mezclar bien y calentar a ebullición, agitando ocasionalmente hasta su completa disolución. Enfriar a 60 °C y ajuste el pH de  $7.3 \pm 0.1$ .

**Principio de acción**

En este medio la concentración de glucosa es la décima parte de la concentración de la lactosa y la sacarosa, lo cual permite determinar cuándo éste es el único glúcido fermentado. La pequeña cantidad de ácido producido por la fermentación de la glucosa es rápidamente oxidado en el bisel donde hay abundancia de oxígeno, quedando el color rojo correspondiente a un medio alcalino; por el contrario, en el taco donde la tensión de oxígeno es baja, la reacción ácida se mantiene. Para que las reacciones antes indicadas ocurran, el medio tiene que estar en un tubo que permita un fácil acceso del aire, por lo que debe contar con tapón de algodón.

La degradación de los carbohidratos acompañada de producción de ácido se detecta mediante el indicador de pH rojo de fenol, el cual cambia su color de rojo-naranja a amarillo, bajo alcalinización se torna rojo intenso. El tiosulfato es reducido por muchas especies bacterianas a ácido sulfhídrico, el cual reacciona con la sal de fierro para dar un sulfuro ferroso de color negro.

Los posibles resultados que se presentan en el medio son:

- Pico alcalino/fondo ácido (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta la glucosa.
- Pico ácido/fondo ácido (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa.
- Pico alcalino/fondo alcalino (pico rojo/fondo rojo): el microorganismo es no fermentador de azúcares.
- La presencia de burbujas o ruptura del medio de cultivo indica que el microorganismo produce gas.
- El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.

#### **Triptona 1%, caldo**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Triptona	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agua destilada	1.0 L
pH	7.5 ± 0.2

#### ***Preparación***

Disolver los ingredientes en 1.0 L de agua destilada, ajustar el pH si es necesario y distribuir en tubos de ensaye. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Conservar en refrigeración (4-10 °C).

**Principio de acción**

La triptona presenta un alto contenido de triptófano, el cual es escindido por los microorganismos que contienen la enzima triptofanasa en indol, ácido pirúvico y amoníaco. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico.

El indol generado es revelado al agregar el reactivo p-dimetilaminobenzaldehído, el cual formará un complejo de color rojo al reaccionar el indol con el grupo aldehído de este reactivo.

**Triptona glucosa extracto de levadura (TGELA),  
agar o agar cuenta estándar**

Ingredientes	Cantidad
Glucosa	1.0 g
Tripticaseína	5.0 g
Extracto de levadura	2.5 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1.0 L

**Preparación**

Mezclar los ingredientes secos e hidratar con 100 mL de agua. Agregar el resto del agua y calentar a ebullición hasta disolver el agar. Esterilizar a  $121 \pm 1$  °C por 15 minutos. El pH final del medio es de  $7.3 \pm 0.2$ .

**Principio de acción**

Este medio es altamente nutritivo y versátil, es recomendado para su uso en general. Debido al contenido de triptona y extracto de levadura, el medio estimula el crecimiento abundante de organismos estresados y exigentes, lo hace muy adecuado para la enumeración de microorganismos en diversos productos como lácteos, agua y bebidas, entre otros. No es selectivo, lo que también asegura máxima recuperación. La glucosa es fuente de carbono, la tripticaseína es fuente de nitrógeno, el extracto de levadura proporciona a los microorganismos compuestos nitrogenados, carbono, azufre, vitaminas (especialmente complejo B), así como factores de crecimiento; de ahí que sea tan buen medio para el crecimiento bacteriano.

**Tripticaseína soya; tripticasa soya;  
soya tripticaseína, agar/caldo (TSA)**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Tripticasa o triptosa	17.0 g
Peptona de soya	5.0 g
Glucosa	2.5 g
Cloruro de sodio	2.5 g
Agar bacteriológico*	15.0 g
Agua destilada	1.0 L

\* El caldo tripticaseína soya carece de este ingrediente.

***Preparación***

Disolver los ingredientes en el agua destilada, calentando lentamente hasta su disolución completa. Distribuir en los envases correspondientes y esterilizar en autoclave a  $121 \pm 1$  °C durante 15 minutos. En caso de requerirse en cajas de Petri, enfriar el agar a 45 °C y verter en condiciones de asepsia.

***Principio de acción***

Este medio es altamente nutritivo y versátil, es recomendado para su uso en general. Debido a la formulación de la triptona y la peptona de soya, el medio estimula el crecimiento abundante de organismos exigentes sin la adición de suero.

**Triptona, caldo T1N0 y triptona sal, caldos T1N1, T1N2, T1N3, T1N6, T1N8 y T1N10, agar/caldo**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Triptona (tripticasa o digerido pancreático de caseína)	10.0 g
Cloruro de sodio	10.0, 20.0, 30.0, 60.0, 80.0 o 100.0 g
Agar*	20.0 g
Agua destilada	1.0 L

\* El caldo carece de este ingrediente.

### **Preparación**

Disolver los ingredientes en agua destilada, para T1N0 no agregar cloruro de sodio, para T1N1 usar 10.0 g de cloruro de sodio (1% w/v concentración de cloruro de sodio). Para T1N3 usar 30.0 g de NaCl por litro (3% w/v concentración de cloruro de sodio). Así respectivamente, para T1N6, T1N8 y T1N10 usar 60.0, 80.0 y 100.0 g de NaCl por litro. Distribuir de 3 a 4 mL en tubos con tapón de rosca, tapar los tubos. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C. Ajustar el pH a  $7.2 \pm 0.2$ . En caso de preparar el medio sólido en tubos después de la esterilización, permitir solidificar los tubos en posición inclinada. Para placas enfriar el medio de 45-50 °C y distribuir en cajas de Petri estériles.

### **Principio de acción**

Algunas especies de *Vibrio* pueden ser halófilas ligeras o halotolerantes. El medio es empleado para el enriquecimiento, aislamiento y/o purificación de cepas de *Vibrio* sp. Algunas especies de *Vibrio* desarrollan en el medio sin concentración de NaCl, mientras que otras desarrollan óptimamente o toleran una concentración de NaCl determinada.

**Urea de Christensen, agar**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Tripteína	1.0 g
Glucosa	1.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato monopotásico	2.0 g
Rojo de fenol	0.012 g
Agar	15.0 g

**Preparación**

Suspender 24.0 g de polvo en 950 mL de agua destilada. Dejar reposar por 2 min. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min. Enfriar a 50 °C y agregar una solución de urea al 40% previamente esterilizada por filtración. Distribuir en tubos, e inclinar para obtener un pico de flauta.

**Principio de acción**

Medio utilizado para diferenciar microorganismos con base en la actividad de la enzima ureasa. Se utiliza para identificar bacterias que hidrolizan urea, tales como *Proteus* spp., otras enterobacterias y estafilococos. En el medio de cultivo, la tripteína y la glucosa aportan los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el rojo de fenol es el indicador de pH. Algunas bacterias hidrolizan la urea por medio de la enzima ureasa, liberando amoníaco y dióxido de carbono. Estos productos alcalinizan el medio haciendo virar el rojo de fenol del amarillo al rojo. En este medio, la fermentación de la glucosa activa la enzima ureasa, acelerando la velocidad del metabolismo en aquellos organismos que hidrolizan lentamente la urea, como especies de *Enterobacter* o *Klebsiella*.

**Verde-Brillante, agar (VB)**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Extracto de levadura	3.0 g
Polipeptona (proteosa peptona No. 3)	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Lactosa	10.0 g
Sacarosa	10.0 g
Rojo de fenol	0.08 g
Agar	20.0 g
Verde brillante	0.0125 g
Agua destilada	1.0 L

**Preparación**

Suspender los ingredientes en el agua destilada y calentar a ebullición, hasta su disolución completa. Ajustar el pH a  $6.9 \pm 0.2$ , esterilizar en autoclave a  $121 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 15 minutos, enfriar el medio a  $50^\circ\text{C}$  y distribuirlo en cajas de Petri estériles. El aspecto del medio es color marrón oscuro.

**Principio de acción**

El medio de cultivo contiene lactosa, cuya degradación a ácido se reconoce por el viraje a amarillo del rojo de fenol, que actúa como indicador de pH. En ambiente alcalino presenta color rojo intenso. La microbiota acompañante Gram positiva, así como *Salmonella* Typhi y *Shigella* resultan muy reprimidas por la presencia del verde brillante. Puesto que *Salmonella* no puede degradar ni la lactosa ni la sacarosa, el contenido en sacarosa permite el reconocimiento de la microbiota acompañante lactosa-positiva débil o lactosa negativa, pero sacarosa-positiva.

Para la inhibición de *Proteus* se recomienda la adición de desoxicolato de sodio al 0.2%. La adición de sulfonamidas mejora el aislamiento de *Salmonella*. Adicionar 1.0 g de sulfonamida o 0.8 g de sulfadiazina por cada litro de medio y esterilizar en la forma habitual.

**Xilosa- Lisina-Desoxicolato, agar (XLD)**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Xilosa	3.75 g
L-lisina	5 g
Lactosa	7 g
Sacarosa	7.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Rojo de fenol	0.08 g
Agar	15.0 g
Desoxicolato de sodio	2.5 g
Citrato férrico amoniacal	0.8 g
Tiosulfato de sodio	6.8 g
Agua destilada	1.0 L

**Preparación**

Suspender los ingredientes en el agua destilada y calentar en baño de agua a 55 °C, agitando frecuentemente, hasta su disolución completa. Ajustar el pH a  $6.9 \pm 0.2$ . Enfriar a ~50 °C y verter en cajas de Petri estériles. No se esterilice. El sobrecalentamiento produce una precipitación, la reactividad del medio puede ser satisfactoria, pero las colonias suelen ser muy pequeñas.

**Principio de acción**

Éste es un medio selectivo ideal para el aislamiento e identificación presuntiva de *Salmonella* y *Shigella*. Basado en la fermentación de la xilosa, la descarboxilación de la lisina y la producción de ácido sulfhídrico para la diferenciación inicial entre *Shigella* y *Salmonella* de otras bacterias no patógenas. La *Salmonella* es reductora de las sales de azufre como el tiosulfato, cuyo producto final es el ácido sulfhídrico, que en presencia de sales de hierro forma el sulfuro ferroso, que es un compuesto de color negro.

La fermentación rápida de la xilosa es casi universal entre las bacterias entéricas, excepto para los miembros de los géneros *Shigella*, *Providencia* y *Edwardsiella*. La xilosa se incluye al medio, de tal forma que las especies del género *Shigella* pueden identificarse por una reacción negativa. Las especies de *Salmonella* se diferencian de los fermentadores no patogénicos por la incorporación de lisina al medio. *Salmonella* consume la xilosa y descarboxila la lisina, alterando el pH hacia la alcalinidad, simulando la reacción presentada por *Shigella*. Sin embargo, la presencia de los géneros *Salmonella* y *Edwardsiella* se diferencia de las de *Shigella* por un indicador de la producción de ácido sulfhídrico.

Por otra parte, la gran concentración de ácido producido por la fermentación de la lactosa y sacarosa evita que los coliformes lisin descarboxilasa-positivos reviertan el pH a un valor alcalino. Los microorganismos no productores de ácido sulfhídrico no descarboxilan la lisina. El nivel de acidez evita el oscurecimiento de estos microorganismos hasta después de 18-24 h de incubación. El desoxicolato de sodio se incorpora al medio como un inhibidor de coliformes sin disminuir el desarrollo de *Shigella* y *Salmonella*.

# ANEXO II

## DILUYENTES, SOLUCIONES Y REACTIVOS

### Agarosa, gel 1% (P/V)

**Precaución: usar guantes para la preparación. FUNDIR LA AGAROSA PREVIAMENTE A LA INCORPORACIÓN DEL BROMURO DE ETIDIO.**

Ingredientes	Cantidad
Agarosa	0.25 g
Amortiguador TBE pH 8.0	25.0 mL
Bromuro de Etidio 0.05%	4.0 $\mu$ L

### ***Preparación***

En un matraz Erlenmeyer suspender la agarosa en el amortiguador TBE, fundir en baño María hirviendo, o bien, en microondas, hasta lograr que los cristales de agarosa se fundan y se observe una solución translúcida. Enfriar a  $\sim 50$  °C. Transferir a un tubo cónico de plástico con tapa, agregar dentro de la agarosa fundida el volumen de bromuro de etidio con micropipeta. Tapar el tubo e invertir varias veces (evitando la formación de burbujas), para lograr la incorporación homogénea de los reactivos. Realizar el vertido de la solución cuando se encuentre aún fundido y licuado a la cámara de electroforesis. Permitir el enfriamiento, para la solidificación del gel.

### ***Principio de acción***

El gel de agarosa es la matriz semisólida, que disminuirá la velocidad de migración del DNA durante la electroforesis. La porosidad del gel dependerá de la concentración de agarosa incorporada. Para el tamaño de las moléculas de DNA trabajadas en el protocolo experimental (de 300 bp hasta 5 Mbp), el tamaño de

poro adecuado se logra con el 1% de agarosa. El bromuro de etidio evidencia la presencia del DNA al ser sometido a la luz UV. El amortiguador TBE pH 8.0 mantiene la integridad del DNA al contener EDTA, que evita la acción de las nucleasas probablemente presentes en el gel, y el carácter aniónico del DNA, favoreciendo la migración al ánodo.

**Amortiguador de fosfato monobásico de potasio pH 7.2  
(solución concentrada; Fosfatos, *buffer*)**

Ingredientes	Cantidad
Fosfato monobásico de potasio	34.0 g
Agua destilada	1.0 L

***Preparación***

Disolver el fosfato en 500 mL de agua y ajustar el pH a 7.2, con solución de hidróxido de sodio 1N, aforar con agua a un litro. Esterilizar la solución a  $121 \pm 1.0$  °C y conservar en refrigeración.

***Solución de trabajo***

Tomar 1.25 mL de la solución concentrada y transferirlos a un matraz volumétrico de un litro, aforando con agua, después de distribuir en matraces o tubos los volúmenes especificados en cada técnica. Esterilizar a  $121 \pm 1.0$  °C durante 15 minutos. Después de la esterilización, los volúmenes finales y el pH deben ser iguales a los iniciales.

***Principio de acción***

El diluyente proporciona condiciones de recuperación para las células dañadas y mantiene un pH adecuado para el análisis, independientemente del pH del alimento. Favorece la recuperación de microorganismos con daño subletal; el *buffer* de fosfatos previene daño en las bacterias por efecto del pH.

**Amortiguador Tris-Boratos-EDTA, para electroforesis  
(TBE, *buffer*)**

**Solución de almacenamiento 10X  
(*Stock*; 10 veces concentrada)**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Tris-HCl	108.0 g
Ácido bórico	55.0 g
EDTA 0.5 M pH 8.0	40.0 mL
Agua grado Biología molecular	Aforo a 1.0 L

**Solución de trabajo 1X;  
concentración final de los reactivos**

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>
Tris base	89.0 mM
Ácido bórico	89.0 mM
EDTA	2.0 mM

***Preparación***

Preparar la solución de EDTA, para lo cual inicialmente se ajustarán los 40.0 mL de agua, grado Biología molecular a pH 8.0. Se adicionará poco a poco y con agitación la cantidad de EDTA calculada. Una vez lista la solución de EDTA, transferir ésta a un matraz aforado de 1.0 L y agregar agua grado Biología molecular hasta la mitad de la capacidad del matraz. Se agregarán poco a poco los gramos calculados del reactivo de Tris-HCl y poco a poco los gramos calculados de ácido bórico. Si es necesario, se puede añadir más agua, pero se debe tener cuidado de no exceder el volumen de aforo. Aforar a 1.0 L. La solución de trabajo se preparará realizando una dilución 1/10 a partir de la solución 10X. Se recomienda mantener en refrigeración ambas soluciones.

**Principio de acción**

El amortiguador TBE aporta los iones con carga necesarios para establecer un campo eléctrico que influenciará la migración de las bandas de DNA (cromosomal, plasmídico o amplicones de PCR), que se deseen visualizar con la técnica de electroforesis. Es necesario un pH de 8.0 para mantener la carga iónica negativa del DNA a analizar y favorecer la migración hacia el ánodo. El EDTA, al ser un reactivo quelante de iones divalentes, secuestra el magnesio, con lo cual se logra inactivar nucleasas que pudieran degradar el material genético a analizar.

**Bromuro de etidio, solución**

**PRECAUCIÓN: compuesto carcinógeno potencial. Debe de ser manipulado con mucho cuidado. Es forzoso el uso de guantes.**

**Solución *stock* 1 000X [0.5 mg/mL]**

Ingredientes	Cantidad
Bromuro de etidio	50.0 mg
Agua grado Biología molecular	100.0 mL

**Preparación**

A partir de la solución de trabajo [0.5 µg/mL], diluir la solución *stock* 1:1 000. Proteger de la luz.

**Principio de acción**

El bromuro de etidio es un agente intercalante de las bases contenidas en el DNA. Se emplea para evidenciar la presencia del material genético en la electroforesis en gel de agarosa. Si el DNA está presente, se observará la fluorescencia blanca brillante, al ser sometido el gel en luz UV con longitud de onda de 254 nm.

**Colorante de corrida o carga para electroforesis**

Reactivo	Concentración
Tris-HCl pH 7.6	10.0 mM
Naranja G	0.15%
Xileno-Cianol FF	0.03%
Glicerol	60.0%
EDTA	60.0 mM

***Preparación***

El proveedor del colorante de corrida generalmente proporciona un microtubo con la mezcla ya lista para su uso. El reactivo debe guardarse en refrigeración.

***Principio de acción***

El Tris pH 7.6 mantiene la carga negativa del DNA a analizar durante la electroforesis. El naranja G y el Xileno-Cianol-FF aportan color y tienen una carga negativa adecuada para el corrimiento, además tienen un carácter negativo mayor al del DNA, por lo que durante el análisis se observará primero la migración de los colorantes, previa a la del DNA. El glicerol aumenta la densidad del DNA para forzar que esta biomolécula se mantenga en el pozo del gel de agarosa. El EDTA, debido a que es un quelante de iones divalentes, inactiva nucleasas que pudieran degradar el DNA durante la corrida.

**Kovac, reactivo para la prueba de producción de indol**

Ingredientes	Cantidad
p-dimetilaminobenzaldehído	5.0 g
Alcohol amílico o alcohol isoamílico	750.0 mL
Ácido clorhídrico concentrado	25.0 mL

**Preparación e interpretación de la prueba**

Disolver el p-dimetilaminobenzaldehído en el alcohol amílico y agregar el ácido clorhídrico lentamente, gota a gota y agitando. Debe conservarse en frasco ámbar con tapón esmerilado; el color del reactivo va del amarillo al café claro. Se debe conservar a 4 °C.

Sembrar un tubo con 5.0 mL de caldo triptona. Incubar a 35 °C durante 48 horas. Agregar de 0.2 a 0.3 mL del reactivo. El desarrollo de un color intenso constituye una prueba positiva para indol.

**Oxidasa, reactivo para la prueba de  
(Modificación de Kovac)**

Ingredientes	Cantidad
N,N,N,N-tetrametil-p-fenilendiamino	0.5 g
Agua destilada	100.0 mL

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

**Uso e interpretación de la prueba**

Inocular el microorganismo que se desea identificar, en un tubo de base de gelosa sangre. Incubar a 35 °C durante 18 horas. Agregar 0.3 mL de reactivo. La reacción positiva se observa por la producción de un color azul en un minuto.

**Peptonada, agua**

Ingredientes	Cantidad
Peptona	1.0 g
Cloruro de sodio	8.5 g
Agua destilada	1.0 L

**Preparación**

Disolver los componentes en un litro de agua destilada, ajustar el pH a 7.0 (con NaOH 0.1N). Distribuir en tubos o matraces, de acuerdo con las necesidades y

esterilizar a  $121 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  / 15 min. Confirmar que después de la esterilización los volúmenes y el pH sean iguales a los iniciales.

### ***Principio de acción***

El hidrolizado de proteína de soya tiene excelentes propiedades de promoción de crecimiento microbiano, proporciona a los microorganismos vitaminas y nitrógeno. La concentración de peptona y de cloruro de sodio, por su efecto en la tonicidad del medio, permiten la recuperación de bacterias dañadas por los procesos a los que han sido sometidos los alimentos.

### **Plasma de conejo, solución (ver Coagulasa, prueba de)**

#### **Reactivos para la Taq-polimerasa®**

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración original</b>
DNA templado (concentración recomendada)	10 pg-1 µg / 50 µL
MgCl <sub>2</sub>	25 mM
Amortiguador 10X compuesto de:	
Tris-HCl pH 8.8 (25 °C)	100 mM
KCl	500 mM
Nonidet P40	0.8%

### ***Preparación***

El proveedor de la Taq-polimerasa® generalmente incluye el amortiguador 10X y el MgCl<sub>2</sub> ya listos para su uso en el lote de enzima adquirido. Los reactivos deben guardarse en congelación a -20 °C. Para realizar la mezcla de reacción, los reactivos deberán descongelarse en baño de hielo. La Taq-polimerasa® deberá mantenerse todo el tiempo en congelación y sólo se retirará del congelador al momento de agregar la cantidad calculada para las reacciones de PCR a realizar. Una vez agregada la enzima, los reactivos deberán congelarse a -20 °C de inmediato. Se deberá realizar esta congelación lo más rápido posible al tratarse de la enzima.

**Principio de acción**

El amortiguador 10X proporciona las condiciones de actividad (pH, fuerza iónica) óptimos para la actividad enzimática de la Taq-polimerasa®. El cloruro de magnesio es el cofactor enzimático. El DNA templado contendrá en alguna parte de su secuencia la región de DNA que se amplificará durante la reacción de PCR.

**Rojo de metilo, indicador para la prueba RM**

Ingredientes	Cantidad
Rojo de metilo	0.1 g
Alcohol etílico	300.0 mL
Agua destilada	200.0 mL

**Preparación e interpretación de la prueba**

Disolver el rojo de metilo en el alcohol y diluir con el agua destilada, para llevar a cabo la prueba; añadir 5 gotas de la solución a 5.0 mL del cultivo problema.

Resultado: un color rojo demuestra un pH menor a 4.5 y la prueba es positiva. Un color amarillo se reporta como prueba negativa.

**Solución salina, al 0.45%**

Ingredientes	Cantidad
Cloruro de sodio	0.45 g
Agua destilada	100 mL

**Preparación**

Disolver el cloruro de sodio en agua destilada y ajustar la solución a pH de 7.0, con solución de hidróxido de sodio 1N. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

***Principio de acción***

Solución isotónica empleada para realizar la suspensión microbiana con el sistema automatizado VITEK®. Ya que las celdas de la tarjeta VITEK® requieren una cantidad mínima de la suspensión, es suficiente con esta concentración de cloruro de sodio, por su efecto en la tonicidad del medio, además de los reactivos incluidos en cada celda. Se permite el mantenimiento de la integridad celular microbiana sin afectarse por la presión osmótica. Se debe mantener máximo por 15 min la dilución en la muestra antes de ser traspasada o inoculada a otro medio con nutrientes adecuados para el grupo microbiano a analizar.

**Solución salina isotónica (SSI),  
al 0.85% (P/V)**

Ingredientes	Cantidad
Cloruro de sodio	8.5 g
Agua destilada	1.0 L

***Preparación***

Disolver el cloruro de sodio en 750 mL de agua destilada, ajustar la solución a pH de 7.0, con solución de hidróxido de sodio 1N; transferir a un matraz volumétrico de un litro, aforar con agua destilada; distribuir en matraces o tubos, de acuerdo con los requerimientos de la técnica y esterilizar a  $121 \pm 1$  °C durante 15 min. Después de la esterilización, los volúmenes y el pH de la solución deben ser iguales a los iniciales.

***Principio de acción***

La concentración de cloruro de sodio, por su efecto en la tonicidad del medio, permite el mantenimiento de la integridad celular microbiana sin afectarse por la presión osmótica. Se debe mantener máximo por 15 min la dilución en la muestra antes de ser traspasada o inoculada a otro medio con nutrientes adecuados para el grupo microbiano a analizar.

**Taq-polimerasa recombinante® (ThermoScientific)****Medio base\***

Reactivo de almacenamiento	Concentración
Tris-HCl (pH 8.0)	20 mM
DTT (ditiotreitól)	1 mM
EDTA	0.1 mM
KCl	100 mM
Nonidet P40	0.5%
Tween 20	0.5%
Glicerol	50%

**Preparación:**

El proveedor de la Taq-polimerasa® generalmente incluye la enzima en un microtubo con el reactivo de almacenamiento. La enzima debe mantenerse a -20 °C.

**Principio de acción**

La Taq DNA polimerasa recombinante (Fermentasâ) es una DNA-polimerasa altamente termoestable recombinante que proviene de *Thermus aquaticus* expresada en *E. coli*. La enzima cataliza la síntesis de DNA en 5'→3', no posee actividad exonucleasa detectable 3'→5' (lectura de prueba) y posee actividad exonucleasa 5'→3. Además muestra actividad desoxynucleotidil transferasa, que frecuentemente resulta en la adición de adeninas extra en el extremo 3' de los productos de PCR. Esta enzima es ideal para amplicones de 5 Kbp o menores. Una unidad de la enzima cataliza la incorporación de 10 nmol de dNTPs en una fracción del polinucleótido en 30 min a 70 °C. El DTT y el EDTA inhiben la actividad de enzimas hidrolíticas que podrían afectar la integridad de la polimerasa o del DNA a amplificar. El Nonidet P40 y Tween 20 son agentes tensoactivos que favorecen la disolución de los componentes sin desnaturalizarlos. El glicerol es un agente crioprotector de la enzima. El Tris-HCl y el KCl proporcionan el pH y fuerza iónicos adecuados para la actividad de la enzima.

## Vaspar, solución

### **Preparación**

Combinar una parte de aceite mineral con dos partes de vaselina y esterilizar a 191 °C durante 3 h. Agregar en la superficie de medios de cultivo para limitar la penetración de oxígeno del aire en pruebas de fermentación de carbohidratos.

### **Voges-Proskauer, reactivos para la prueba (VP)**

Esta prueba es para comprobar la presencia del diacetilo.

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Alfa naftol	5.0 g
Alcohol etílico absoluto	100.0 mL

### **Preparación e interpretación de la prueba**

Añadir 0.6 mL de la solución de alfa naftol y 0.2 mL de una solución acuosa al 40% de KOH a 1.0 mL de cultivo. Para intensificar y acelerar la reacción, añadir unos cuantos cristales de creatinina al medio.

Resultado: el desarrollo de una coloración roja-rosa en 15 minutos en presencia de oxígeno (destapar el tubo en este tiempo) constituye una reacción positiva.



# ANEXO III

## TABLAS DEL NÚMERO MÁS PROBABLE

**TABLA 3.1** Índice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos (diluciones 10, 1.0 y 0.1 g).<sup>a</sup>

Combinación de positivos	3 tubos por dilución			5 tubos por dilución		
	Índice del NMP por g	95% límites de confianza		Índice del NMP por g	95% límites de confianza	
		Bajo	Alto		Bajo	Alto
0-0-0	< 0.03	<0.005	<0.09	<0.02	<0.005	<0.07
0-0-1	0.03	<0.005	<0.09	0.02	<0.005	0.07
0-1-0	0.03	<0.005	0.13	0.02	<0.005	0.07
0-2-0	--	--	--	0.04	<0.005	0.11
1-0-0	0.04	<0.005	0.20	0.02	<0.005	0.07
1-0-1	0.07	0.01	0.21	0.04	<0.005	0.11
1-1-0	0.07	0.01	0.23	0.04	<0.005	0.11
1-1-1	0.11	0.03	0.36	0.06	<0.005	0.15
1-2-0	0.11	0.03	0.36	0.06	<0.005	0.15
2-0-0	0.09	0.01	0.36	0.05	<0.005	0.13
2-0-1	0.14	0.03	0.37	0.07	0.01	0.17
2-1-0	0.15	0.03	0.44	0.07	0.01	0.17
2-1-1	0.20	0.07	0.89	0.09	0.02	0.21
2-2-0	0.21	0.04	0.47	0.09	0.02	0.21
2-2-1	0.28	0.10	1.50	--	--	--
2-3-0	--	--	--	0.12	0.03	0.28
3-0-0	0.23	0.04	1.20	0.08	0.01	0.19
3-0-1	0.39	0.07	1.3	0.11	0.02	0.25
3-0-2	0.64	0.15	3.80	--	--	--
3-1-0	0.43	0.07	2.1	0.11	0.02	0.25
3-1-1	0.75	0.14	2.3	0.14	0.04	0.34
3-1-2	1.20	0.30	3.8	--	--	--
3-2-0	0.93	0.15	3.80	0.14	0.04	0.34
3-2-1	1.50	0.30	4.40	0.17	0.05	0.46
3-2-2	2.10	0.35	4.70	0.20	---	---
3-3-0	2.40	0.36	13.0	0.17	--	--
3-3-1	4.60	0.71	24.0	0.17	---	--
3-3-2	11.0	1.50	48.0	0.21	---	---
3-3-3	>11.0	>1.50	>48.0	0.28	--	--

TABLA 3.1 (Continúa)

Combinación de positivos	3 tubos por dilución			5 tubos por dilución		
	Índice del NMP por g	95% límites de confianza		Índice del NMP por g	95% límites de confianza	
		Bajo	Alto		Bajo	Alto
4-0-0	--			0.13	0.03	0.31
4-0-1	--			0.17	0.15	0.46
4-1-0	--			0.17	0.05	0.46
4-1-1	--			0.21	0.07	0.63
4-1-2	--			0.26	0.09	0.78
4-2-0	--			0.22	0.07	0.67
4-2-1	--			0.26	0.09	0.78
4-3-0	--			0.27	0.09	0.80
4-3-1	--			0.33	0.11	0.93
4-4-0	--			0.34	0.12	0.93
5-0-0	--			0.23	0.07	0.70
5-0-1	--			0.31	0.11	0.89
5-0-2	--			0.43	0.15	1.14
5-1-0	--			0.33	0.11	0.93
5-1-1	--			0.46	0.16	1.2
5-1-2	--			0.63	0.21	1.5
5-2-0	--			0.49	0.17	1.3
5-2-1	--			0.70	0.23	1.70
5-2-2	--			0.94	0.28	2.2
5-3-0	--			0.79	0.25	1.9
5-3-1	--			1.10	0.31	2.5
5-3-2	--			1.4	0.37	3.4
5-3-3	--			1.80	0.44	5.0
5-4-0	--			1.30	0.35	3.0
5-4-1	--			1.70	0.43	4.9
5-4-2	--			2.20	0.57	7.0
5-4-3	--			2.80	0.90	8.5
5-4-4	--			3.50	1.20	10.0
5-5-0	--			2.40	0.68	7.5
5-5-1	--			3.50	1.60	10.0
5-5-2	--			5.40	1.80	14.0
5-5-3	--			9.20	3.0	32.0
5-5-4	--			16.00	6.40	58.0
5-5-5	--			>16.00	>6.40	>58.0

<sup>a</sup>Fuente: *Bacteriological Analytical Manual* (1984). Food and Drugs Administration FDA. Bureau of Foods. Division of Microbiology 6a. Ed. Washington, D.C.

**TABLA 3.2** Índice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos (diluciones 1.0, 0.1 y 0.01 g).<sup>a</sup>

Combinación de positivos	3 tubos por dilución			5 tubos por dilución		
	Índice del NMP por g	95% límites de confianza		Índice del NMP por g	95% límites de confianza	
		Bajo	Alto		Bajo	Alto
0-0-0	<0.3	<0.05	<0.9	<0.2	<0.05	<0.7
0-0-1	0.3	<0.05	<0.9	0.2	<0.05	0.7
0-1-0	0.3	<0.5	1.3	0.2	<0.05	0.7
0-2-0	--b	--	--	0.4	<0.05	0.11
1-0-0	0.4	<0.05	2.0	0.2	<0.05	0.7
1-0-1	0.7	0.1	2.0	0.4	<0.05	1.1
1-1-0	0.7	0.1	2.3	0.4	<0.05	1.1
1-1-1	1.1	0.3	3.6	0.6	<0.05	1.5
1-2-0	1.1	0.3	3.6	0.6	<0.05	1.5
2-0-0	0.9	0.1	3.6	0.5	<0.05	1.3
2-0-1	1.4	0.3	3.7	0.7	0.1	1.7
2-1-0	1.5	0.3	4.4	0.7	0.1	1.7
2-1-1	2.0	0.7	8.9	0.9	0.2	2.1
2-2-0	2.1	0.4	4.7	0.9	0.2	2.1
2-2-1	2.8	1.0	15.0	--	--	--
2-3-0	--	--	--	1.2	0.3	2.0
3-0-0	2.3	0.4	12.0	0.8	0.1	1.9
3-0-1	3.9	0.7	13.0	1.1	0.2	2.5
3-0-2	6.4	1.5	38.0	---	---	--
3-1-0	4.3	0.7	21.0	1.1	0.2	2.5
3-1-1	7.5	1.4	23.0	1.4	0.4	3.4
3-1-2	12.0	3.0	38.0	--	--	--
3-2-0	9.3	1.5	38.0	1.4	0.4	3.4
3-2-1	15.0	3.0	44.0	1.7	0.5	4.6
3-2-2	21.0	3.5	47.0	---	---	---
3-3-0	24.0	3.6	130.0	---	---	---
3-3-1	46.0	7.1	240.0	---	---	---
3-3-2	110.0	15.0	480.0	---	---	---
3-3-3	>110.0	>15.0	>480.0	---	---	---
4-0-0	---			1.3	0.3	3.1
4-0-1	---			1.7	0.5	4.6
4-1-0	---			1.7	0.5	4.6
4-1-1	---			2.1	0.7	6.3
4-1-2	---			2.6	0.9	7.8
4-2-0	---			2.2	0.7	6.7

TABLA 3.2 (Continúa)

Combinación de positivos	3 tubos por dilución			5 tubos por dilución		
	Índice del NMP por g	95% límites de confianza		Índice del NMP por g	95% límites de confianza	
		Bajo	Alto		Bajo	Alto
4-2-1	---			2.6	0.9	7.8
4-3-0	---			2.7	0.9	8.0
4-3-1	---			3.3	1.1	9.3
4-4-0	---			3.4	1.2	9.3
5-0-0	---			2.3	0.7	7.0
5-0-1	---			3.1	1.1	8.9
5-0-2	---			4.3	1.5	11.4
5-1-0	---			3.3	1.1	9.3
5-1-1	---			4.6	1.6	12.0
5-1-2	---			6.3	2.1	15.0
5-2-0	---			4.9	1.7	13.0
5-2-1	---			7.0	2.3	17.0
5-2-2	---			9.4	2.8	22.0
5-3-0	---			7.9	2.5	19.0
5-3-1	---			11.0	3.1	25.0
5-3-2	---			14.0	3.7	34.0
5-3-3	---			18.0	4.4	50.0
5-4-0	---			13.0	3.5	30.0
5-4-1	---			17.0	4.3	49.0
5-4-2	---			22.0	5.7	70.0
5-4-3	---			28.0	9.0	85.0
5-4-4	---			35.0	12.0	100.0
5-5-0	---			24.0	6.8	75.0
5-5-1	---			35.0	12.0	100.0
5-5-2	---			54.0	19.0	140.0
5-5-3	---			92.0	30.0	320.0
5-5-4	---			160.0	64.0	580.0
5-5-5	---			>160.0	>64.0	>580.0

<sup>a</sup>Fuente: *Bacteriological Analytical Manual*. (1984). Food and Drugs Administration FDA. Bureau of Foods. Division of Microbiology. 6a Ed. Washington, D.C.

**TABLA 3.3** Índice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos (diluciones 0.1, 0.01 y 0.001 g).<sup>a</sup>

Combinación de positivos	3 tubos por dilución			5 tubos por dilución		
	índice del NMP por g	95% límites de confianza		índice del NMP por g	95% límites de confianza	
		Bajo	Alto		Bajo	Alto
0-0-0	<3	<0.5	<9	<2	<0.5	<7
0-0-1	3	<0.5	9	2	<0.5	7
0-1-0	3	<0.5	13	2	<0.5	7
0-2-0	---	---	---	4	<0.5	11
1-0-0	4	<0.5	20	2	<0.5	7
1-0-1	7	1	21	4	<0.5	11
1-1-0	7	1	23	4	<0.5	11
1-1-1	11	3	36	6	<0.5	15
1-2-0	11	3	36	6	<0.5	15
2-0-0	9	1	36	5	<0.5	13
2-0-1	14	3	37	7	1.0	17
2-1-0	15	3	44	7	1.0	17
2-1-1	20	7	89	9	2.0	21
2-2-0	21	4	47	9	2.0	21
2-2-1	28	10	150	---	---	---
2-3-0	---	---	---	12	3.0	28
3-0-0	23	4	120	8	1.0	19
3-0-1	39	7	13	11	2.0	25
3-0-2	64	15	380	---	---	---
3-1-0	43	7	210	11	2.0	25
3-1-1	75	14	230	14	4.0	34
3-1-2	120	30	380	---	---	---
3-2-0	93	15	380	14	4.0	34
3-2-1	150	30	440	17	5.0	46
3-2-2	210	35	470	---	---	---
3-3-0	240	36	130	---	---	---
3-3-1	460	71	240	---	---	---
3-3-2	1100	150	480	---	---	---
3-3-3	>1100	>150	>480	---	---	---
4-0-0	---			13	3.0	31
4-0-1	---			17	5.0	46
4-1-0	---			17	5.0	46
4-1-1	---			21	7.0	63
4-1-2	---			26	9.0	78
4-2-0	---			22	7.0	67

TABLA 3.3 (Continúa)

Combinación de positivos	3 tubos por dilución			5 tubos por dilución		
	índice del NMP por g	95% límites de confianza		índice del NMP por g	95% límites de confianza	
		Bajo	Alto		Bajo	Alto
4-2-1	---			26	9.0	78
4-3-0	---			27	9.0	80
4-3-1	---			33	11.0	93
4-4-0	---			34	12.0	93
5-0-0	---			23	7.0	70
5-0-1	---			31	11.0	89
5-0-2	---			43	15.0	114
5-1-0	---			33	11.0	93
5-1-1	---			46	16.0	120
5-1-2	---			63	21.0	150
5-2-0	---			49	17.0	130
5-2-1	---			70	23.0	170
5-2-2	---			94	28.0	220
5-3-0	---			79	25.0	190
5-3-1	---			110	31.0	250
5-3-2	---			140	37.0	340
5-3-3	---			180	44.0	500
5-4-0	---			130	35.0	300
5-4-1	---			170	43.0	490
5-4-2	---			220	57.0	700
5-4-3	---			280	90.0	850
5-4-4	---			350	120.0	1000
5-5-0	---			240	68.0	750
5-5-1	---			350	120.0	1000
5-5-2	---			540	180.0	1400
5-5-3	---			920	300.0	3200
5-5-4	---			1600	640.0	5800
5-5-5	---			>1600	>640.0	>5800

<sup>a</sup>Fuente: *Bacteriological Analytical Manual*. (1984). Food and Drugs Administration FDA. Bureau of Foods. Division of Microbiology. 6a Ed. Washington, D.C.

**TABLA 3.4** Índice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos (diluciones 0.01, 0.001 y 0.0001 g).<sup>a</sup>

Combinación de positivos	3 tubos por dilución			5 tubos por dilución		
	Índice del NMP por g	95% límites de confianza		Índice del NMP por g	95% límites de confianza	
		Bajo	Alto		Bajo	Alto
0-0-0	<30	<5	<90	<20	<5	<70
0-0-1	30	<5	<90	20	<5	70
0-1-0	30	<5	130	20	<5	70
0-2-0	---	---	---	40	<5	110
1-0-0	40	<5	200	20	<5	70
1-0-1	70	10	210	40	<5	110
1-1-0	70	10	230	40	<5	110
1-1-1	110	30	360	60	<5	150
1-2-0	110	30	360	60	<5	150
2-0-0	90	10	360	50	<5	130
2-0-1	140	30	370	70	10	170
2-1-0	150	30	440	70	10	170
2-1-1	200	70	890	90	20	210
2-2-0	210	40	470	90	20	210
2-2-1	280	100	1500	---	---	---
2-3-0	---	---	---	120	30	280
3-0-0	230	40	1200	80	10	190
3-0-1	390	70	1300	110	20	250
3-0-2	640	150	3800	---	---	---
3-1-0	430	70	2100	110	20	250
3-1-1	750	140	2300	140	40	340
3-1-2	1200	300	3800	---	---	---
3-2-0	930	150	3800	140	40	340
3-2-1	1500	300	4400	170	50	460
3-2-2	2100	350	4700	---	---	---
3-3-0	2400	360	13000	---	---	---
3-3-1	4600	710	24000	---	---	---
3-3-2	11000	1500	48000	---	---	---
3-3-3	>11000	>1500	>48000	---	---	---
4-0-0	---			130	30	310
4-0-1	---			170	50	460
4-1-0	---			170	50	460
4-1-1	---			210	70	630
4-1-2	---			260	90	780
4-2-0	---			220	70	670

TABLA 3.4 (Continúa)

Combinación de positivos	3 tubos por dilución			5 tubos por dilución		
	Índice del NMP por g	95% límites de confianza		Índice del NMP por g	95% límites de confianza	
		Bajo	Alto		Bajo	Alto
4-2-1	---			260	90	780
4-3-0	---			270	90	800
4-3-1	---			330	110	930
4-4-0	---			340	120	930
5-0-0	---			230	70	700
5-0-1	---			310	110	890
5-0-2	---			430	150	1140
5-1-0	---			330	110	930
5-1-1	---			460	160	1200
5-1-2	---			630	210	1500
5-2-0	---			490	170	1300
5-2-1	---			700	230	1700
5-2-2	---			940	280	2200
5-3-0	---			790	250	1900
5-3-1	---			1100	310	2500
5-3-2	---			1400	370	3400
5-3-3	---			1800	440	5000
5-4-0	---			1300	350	3000
5-4-1	---			1700	430	4900
5-4-2	---			2200	570	7000
5-4-3	---			2800	900	8500
5-4-4	---			3500	1200	10000
5-5-0	---			2400	680	7500
5-5-1	---			3500	120.0	10000
5-5-2	---			5400	1800	1400
5-5-3	---			9200	3000	32000
5-5-4	---			16000	6400	58000
5-5-5	---			>16000	>6400	>58000

<sup>a</sup>Fuente: *Bacteriological Analytical Manual*. 1984. Food and Drugs Administration FDA. Bureau of Foods. Division of Microbiology. 6a Ed. Washington, D.C.

# ANEXO IV

## API® 20E

Tabla 4.1. Pruebas bioquímicas que contiene la galería API® 20E.

Prueba	Reacción / Enzimas	Negativo	Positivo
<b>ONPG</b>	Beta-galactosidasa	sin color	amarillo (1)
<b>ADH</b>	Arginina deshidrolasa	amarillo	rojo o naranja (2)
<b>LDC</b>	Lisina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja (2)
<b>ODC</b>	Ornitina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja (2)
<b>CIT</b>	Utilización del citrato	verde	azul oscuro o turquesa (3)
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Producción de H <sub>2</sub> S	sin precipitado negro	precipitado negro
<b>URE</b>	Ureasa	amarillo	rojo o naranja (2)
<b>TDA</b>	Triptófano desaminasa <sup>1</sup>	amarillo	marrón oscuro (5)
<b>IND</b>	Producción de indol	amarillo	anillo rojo (5)
<b>VP</b>	Producción de acetoina (Voges-Proskauer)	amarillo	marrón-rojo (5)
<b>GEL</b>	Gelatinasa	sin difusión de pigmento negro	difusión de pigmento negro
<b>GLU</b>	Fermentación/oxidación de glucosa (4)	azul o verde	amarillo
<b>MAN</b>	Fermentación/oxidación de manitol (4)	azul o verde	amarillo
<b>INO</b>	Fermentación/oxidación de inositol(4)	azul o verde	amarillo
<b>SOR</b>	Fermentación/oxidación de sorbitol (4)	azul o verde	amarillo
<b>RHA</b>	Fermentación/oxidación de ramnosa (4)	azul o verde	amarillo
<b>SAC</b>	Fermentación/oxidación de sacarosa (4)	azul o verde	amarillo
<b>MEL</b>	Fermentación/oxidación de melódiosa (4)	azul o verde	amarillo
<b>AMY</b>	Fermentación/oxidación de amígdalina (4)	azul o verde	amarillo
<b>ARA</b>	Fermentación/oxidación de arabinosa (4)	azul o verde	amarillo
<b>OX</b>	Citocromo oxidasa (6)	sin color	azul

(1) Un amarillo muy pálido debe considerarse como positivo.

(2) Un color naranja después de 24 h de incubación debe considerarse negativo.

(3) La lectura debe hacerse en la cúpula (aerobiosis).

(4) La fermentación empieza en la parte inferior de los tubos, la oxidación en la cúpula.

(5) TDA: agregar cloruro férrico, lectura inmediata después de agregar el reactivo. IND: agregar reactivo de Kovac, lectura 2 min después de agregar el reactivo. VP: agregar hidróxido de potasio 40% y α-naftol, lectura 10 min después de agregar los reactivos.

(6) Añadir una gota del reactivo (tetrafenilendiamina) recién preparado. Positivo = color azul que aparece inmediatamente.

### ***Principio de acción de cada cúpula en el sistema API 20E®***

#### **ONPG**

La lactosa puede ser fermentada de manera rápida (18-24 horas), en forma lenta, o puede no ser fermentada. Los microorganismos que la fermentan rápidamente poseen 2 enzimas:  $\beta$ -galactósido permeasa, la cual está localizada en la membrana celular y está involucrada en el transporte de la lactosa, y la  $\beta$ -D-galactosidasa, que es intracelular y está involucrada en la hidrólisis de la lactosa a galactosa y glucosa. Los microorganismos fermentadores lentos de lactosa son deficientes en  $\beta$ -galactósido permeasa, pero no en  $\beta$ -D-galactosidasa, y los microorganismos no fermentadores no poseen ninguna de las 2 enzimas. Los discos contienen ONPG (orto-nitrofenilgalactopiranosido), el cual tiene la característica de entrar rápidamente al interior de la célula bacteriana, sin la necesidad de utilizar la  $\beta$ -galactósido permeasa, y allí es metabolizado por la  $\beta$ -D-galactosidasa, liberándose o-nitro-fenol, compuesto de color amarillo.

En la tira API, la hidrólisis de Ortonitrofenol- $\beta$ -galactósido ocurre dando la producción de galactosa y o-nitrofenol, con producción de un compuesto colorido amarillo en condiciones alcalinas.

#### **ADH, LDC, ODC**

Descarboxilación de arginina, lisina y ornitina. Remoción del grupo carboxilo de los aminoácidos que producen aminas y  $\text{CO}_2$ , se utilizan caldos que contienen el aminoácido correspondiente, glucosa y un indicador de pH como bromocresol violeta y en la tira API® 20E rojo de fenol o rojo de cresol.

Se añade aceite mineral para crear condiciones anaeróbicas, los ácidos producidos por la fermentación activa la descarboxilasa que produce aminas alcalinas que neutralizan el medio, lo cual cambia el medio de amarillo (ácido) a rojo/naranja.

#### **CIT**

La utilización de citrato como única fuente de carbono en condiciones aeróbicas. La permeasa de citrato permite el transporte de citrato al interior de la célula y la enzima citrasa convierte el citrato en ácido pirúvico y  $\text{CO}_2$ . El medio contiene citrato de sodio, sales de amonio y azul bromotimol como indicador de pH. El  $\text{CO}_2$

liberado se combina con el sodio que es alcalino cambiando el bromotimol de verde a azul intenso.

El citrato de sodio es una sal del ácido cítrico, un compuesto orgánico simple que constituye uno de los metabolitos del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Generalmente, los microorganismos que emplean el citrato como única fuente de carbono utilizan sales de amonio como única fuente de nitrógeno. El metabolismo del citrato realizado por algunas bacterias se realiza por el ciclo de Krebs y requiere el desdoblamiento del citrato por la enzima citritasa (citrato-oxalacetato-liasa o citrato desmolasa) en presencia de magnesio o manganeso y de transportadores como citrato permeasas.

La citritasa actúa sobre el citrato produciendo ácido oxalacético y acetato; productos que son convertidos enzimáticamente a piruvato y dióxido de carbono. Durante esta reacción, el medio comienza a alcalinizarse por el  $\text{CO}_2$  que se genera, el cual se combina con el agua y el sodio para formar carbonato, un producto alcalino. Este carbonato da la alcalinidad que produce el cambio de color del indicador de pH del medio de verde a azul Prusia oscuro (indicador: azul de bromotimol, amarillo a  $\text{pH} < 6.0$  y azul a  $\text{pH} > 7.6$ ). El medio incluye citrato como única fuente de carbono y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno.

## **H<sub>2</sub>S**

Las enzimas responsables de esta prueba son la cisteína desulfurasa y la tiosulfato reductasa.

El metabolismo de la bacteria reacciona con el tiosulfato de sodio que es un intermediario en la reacción de reducción en medio ácido, dando la producción del ácido sulfhídrico que es un gas. Se detecta cuando el gas entra en contacto con ciertos metales como plomo, hierro o bismuto y forman sulfuro de estos metales.

El gas incoloro  $\text{H}_2\text{S}$  reacciona con una sal fuerte de hierro, el citrato de amonio férrico, para producir un precipitado negro insoluble de sulfuro ferroso metálico. Se recomienda el uso de citrato de amonio férrico en lugar de citrato férrico porque es más soluble. El sulfato ferroso puede sustituir la sal férrica.

Se observa un precipitado negro insoluble.

## **URE**

La enzima ureasa ataca el enlace entre el carbono y nitrógeno de la urea produciendo  $\text{CO}_2$ , y agua y amonio donde el vire rojo/amarillo, con el indicador rojo de fenol.

## **TDA**

Se detecta la presencia de la enzima triptófano desaminasa, que produce la desaminación del sustrato triptófano y se identifica por adición de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), dando una coloración roja/marrón inmediata.

## **IND**

Hidrólisis de triptófano produciendo indol, ácido pirúvico y amoniaco, se revela con el reactivo de Kovac que reacciona con el indol, produciendo un compuesto rojizo-rosado.

El indol es uno de los productos de la degradación metabólica del aminoácido. Las bacterias que producen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoniaco. La prueba del indol está basada en la formación de un complejo rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído p-dimetilaminobenzaldehído. Éste es el principio activo del reactivo de Kovac.

## **VP**

Producción de alcohol y 2,3 butanodiol en lugar de ácidos a partir de un azúcar, mide la producción de acetoina que es precursor del 2,3 butanodiol, luego de un periodo de incubación de 24 horas se añade alfa-naftol al 5% y KOH al 40%, dando una prueba positiva la formación de un complejo rojo-rosado.

## **GEL**

La producción de la enzima gelatinasa rompe la estructura de la gelatina y la licúa dando la difusión del pigmento negro (carbón activado).

## **Fermentación GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA**

Oxidación parcial de un compuesto orgánico utilizando intermediarios orgánicos como donantes y aceptores de electrones, donde el ATP producido proviene de la fosforilación a nivel sustrato.

Los azúcares son glucosa, manitol, inositol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melibiosa, amigdalina y arabinosa, los cuales al ser utilizados dan producción de ácidos, modificando el pH y virando el medio a amarillo por el indicador azul de bromotimol.

## **OX**

La prueba de oxidasa es representativa de los procesos aeróbicos propios de bacterias oxidativas que generan energía a partir de compuestos orgánicos utilizando oxígeno y liberando CO<sub>2</sub> y agua.

Las oxidasas son enzimas importantes en la cadena de transporte de electrones durante la respiración aeróbica. La prueba requiere tetrametil-p-fenilendiamina que reacciona hacia un color azul oscuro. Se puede realizar tomando el crecimiento de la colonia con un palillo de madera e inocularlo en papel filtro. Después se adiciona una gota de tetrametil-p-fenilendiamina.

### ***Pruebas de nitrato***

Se utiliza para bacterias quimioheterotróficas que utilizan el nitrato como aceptor final de electrones durante la respiración anaeróbica.

El medio de cultivo contiene extracto de carne, peptona y nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>). Se requiere la adición de ácido sulfanílico y dimetil- $\alpha$ -naftilamina, dando una prueba positiva la coloración roja en presencia de nitrito.

Para completar la identificación, puede ser necesario realizar pruebas complementarias (se refieren al apartado de identificación).

### ***Pruebas complementarias***

En algunos casos, el perfil de 7 dígitos no es suficientemente discriminatorio y se necesitan realizar las siguientes pruebas complementarias:

### **Reducción de los nitratos a nitritos (NO<sub>2</sub>) y hasta el nitrógeno gas (N<sub>2</sub>)**

Añadir una gota de cada uno de los reactivos de Greiss: solución A ( $\alpha$ -naftilamina), solución B (ácido sulfanílico), al microtubo de GLU. Esperar de 2 a 5 minutos. Un color rojo indica una reacción positiva, presencia de nitritos (NO<sub>2</sub>). Una reacción negativa (amarillo) puede ser debido a la reducción a nitrógeno (como a veces se evidencia por las burbujas de gas), por lo tanto es necesario añadir de 2 a 3 mg de polvo de zinc al tubo GLU. Después de 5 minutos, si el tubo se mantiene amarillo indica una reacción positiva (N<sub>2</sub>) que se deberá registrar en la hoja de resultados. Si la prueba resulta de color naranja, se trata de una reacción negativa, los nitratos todavía presentes en el tubo se han reducido por el zinc. Esta reacción es útil cuando se prueba Gram negativas, oxidasa positivas.

### **Motilidad (MOB)**

Para registrar este resultado se puede hacer referencia a cualquiera de los siguientes medios de cultivo, inoculando la muestra, en donde se puede ver esta característica, como agar SIM, agar Kligler, agar LIA o agar triple azúcar.

### **Crecimiento en medio de agar MacConkey (MCC)**

Inocular por agotamiento radial en cuadrantes, la muestra en este agar y determinar si crece o no.

### **Oxidación de glucosa (DE-O) y fermentación de glucosa (DE-F)**

Por prueba se inoculan dos tubos de medio caldo Hugh y Leifson, uno de ellos se sella con aceite mineral para interpretar el tipo de metabolismo.

Estas pruebas complementarias se pueden utilizar para formar un perfil de 9 dígitos y se obtiene la identificación de la muestra con el *software* de identificación.

**BIBLIOGRAFÍA**

- APÉNDICE G. Identificación bioquímica de enterobacterias por el sistema API® 20E. Recuperado el 18 de octubre de 2016 de [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/API20E\\_18841.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/API20E_18841.pdf)
- API20eInstructions.pdf. Recuperado el 18 de octubre de 2016 de <http://faculty.fiu.edu/~makemson/MCB3020Lab/API20eInstructions.pdf>



# ANEXO V

## INFORMACIÓN DE TARJETA ID-GN VITEK® 2 SYSTEMS

**TABLA 5.1** Pruebas bioquímicas que contiene la tarjeta VITEK® 2 Systems, para identificación bioquímica de microorganismos Gram negativos.

Prueba (abreviatura)	Reacción / Enzima	Cantidad por pocillo	No. de pocillo
APPA	Ala-Fe- Pro- ARILAMIDASA	0.0384 mg	2
ADO	ADONITOL	0.1875 mg	3
PyrA	L-Pirrolidoniol- ARILAMIDASA	0.018 mg	4
IARL	L-ARABITOL	0.3 mg	5
dCEL	D-CELOBIOSA	0.3 mg	7
BGAL	BETA-GALACTOSIDASA	0.036 mg	9
H <sub>2</sub> S	Producción de H <sub>2</sub> S (ácido sulfhídrico)	0.0024 mg	10
BNAG	BETA-N-ACETIL-GLUCOSAMINIDASA	0.0408 mg	11
AGLTp	Glutamil Arilamidasa pNA	0.0324 mg	12
dGLU	D-GLUCOSA	0.3 mg	13
GGT	GAMMA-GLUTAMIL-TRANSFERASA	0.0228 mg	14
OFF	FERMENTACIÓN/GLUCOSA	0.45 mg	15
BGLU	BETA-GLUCOSIDASA	0.036 mg	17
dMAL	D-MALTOSA	0.3 mg	18
dMAN	D-MANITOL	0.1875 mg	19
dMNE	D-MANOSA	0.3 mg	20
BXYL	BETA-XILOSIDASA	0.0324 mg	21
BAlap	BETA-Alanina arilamidasa pNA	0.0174 mg	22
ProA	L-Prolina-ARILAMIDASA	0.0234 mg	23
LIP	LIPASA	0.0192 mg	26
PLE	PALATINOSA	0.3 mg	27
TyrA	Tirosina ARILAMIDASA	0.0276 mg	29
URE	UREASA	0.15 mg	31
dSOR	D-SORBITOL	0.1875 mg	32
SAC	SACAROSA	0.3 mg	33
dTAG	D-TAGATOSA	0.3 mg	34
dTRE	D-TREALOSA	0.3 mg	35
CIT	CITRATO (SODIO)	0.054 mg	36
MNT	MALONATO	0.15 mg	37
5KG	5-CETO-D-GLUCONATO	0.3 mg	39
ILATk	Alcalinización de L-LACTATO	0.15 mg	40
AGLU	ALFA-GLUCOSIDASA	0.036 mg	41
SUCT	Alcalinización de SUCCINATO	0.15 mg	42

**TABLA 5.1** (Continúa)

Prueba (abreviatura)	Reacción / Enzima	Cantidad por pocillo	No. de pocillo
NAGA	Beta-N-ACETIL-GALACTOSAMINIDASA	0.0306 mg	43
AGAL	ALFA-GALACTOSIDASA	0.036 mg	44
PHOS	FOSFATASA	0.0504 mg	45
GlyA	Glicina ARILAMIDASA	0.012 mg	46
ODC	ORNITINA DESCARBOXILASA	0.3 mg	47
LDC	LISINA DESCARBOXILASA	0.15 mg	48
ODEC	BASE DESCARBOXILASA	NC	52
IHISa	Asimilación de L-HISTIDINA	0.087 mg	53
CMT	COURMARATO	0.126 mg	56
BGUR	BETA-GLUCURONIDASA	0.0378 mg	57
O129R	RESISTENCIA O/129 (comp. vibrio)	0.0105 mg	58
GGAA	Glu-Gly-Arg-ARILAMIDASA	0.0576 mg	59
IMLTa	Asimilación de L-MALATO	0.042 mg	61
ELLM	ELLMAN	0.03 mg	62
ILATa	Asimilación de L-LACTATO	0.186 mg	64

**Nota:** los pocillos con los números entre 1 y 64 no designados en esta tabla están vacíos.

### ***Principio de acción en cada pocillo de la tarjeta ID-GN VITEK® 2 Systems***

#### **ADO, IARL, dCEL, dGLU, dMAL, dMAN, dMNE, dSOR, SAC, dTRE, dTAG**

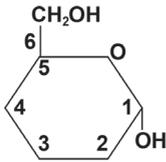
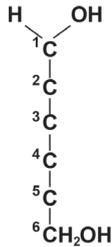
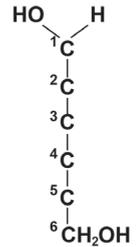
Capacidad de los organismos de crecer utilizando/asimilando una sola fuente específica de carbono para producir ácido. Los hidratos de carbono se pueden clasificar en: a) monosacáridos, aldehídos polihidroxilados o cetonas; b) oligosacáridos (polímeros de monosacáridos); c) alcoholes polihídricos y ciclitoles. Algunos de ellos presentes en la tarjeta VITEK® para gram negativos son:

- Monosacáridos hexosas: glucosa, manosa.
- Disacáridos: celobiosa, maltosa, sacarosa, trealosa.
- Alcoholes: adonitol, manitol, sorbitol, arabitol.

#### **a,bGAL**

Demostrar la presencia o ausencia de las enzimas  $\alpha$ -galactosidasa y  $\beta$ -galactosidasa. La enzima beta-galactosidasa es una enzima inducida que actúa específicamente

sobre galactósidos simples. Un glucósido es un compuesto acetal formado a partir de un hidrato de carbono que existe en una de dos formas:  $\alpha$  o  $\beta$ . En la forma  $\beta$  los grupos hidroxilo (OH) en el carbono número 1 se encuentran por encima del plano del anillo a la izquierda en la forma de cadena abierta, mientras que en la forma  $\alpha$ , se encuentran por debajo del plano o a la derecha en una cadena abierta. Y será de esta forma como incidan las enzimas sobre los glucósidos.

Forma  $\alpha$ Forma  $\beta$ 

## BGUR

La actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa se limita a los géneros *Escherichia coli*, *Shigella* y *Salmonella*, que deben diferenciarse fácilmente por la capacidad de fermentar la lactosa. *Escherichia coli* produce esta enzima, que hidroliza los derivados beta-D-glucopiranosidos-urónicos a aglicones y ácido D-glucurónico; sin embargo, muchas cepas patógenas del microorganismo (*E. coli* O157:H7 o ECEH) no lo hacen debido a que no producen la enzima.

## BGLU

Es una enzima glucosidasa que actúa sobre los enlaces  $\beta$ 1- $\rightarrow$ 4 que unen dos glucosas o moléculas, con sustituciones de glucosa (como el disacárido celobiosa). Es una exocelulasa con especificidad para varios sustratos de -D-glucósidos. Cataliza la hidrólisis de residuos terminales no reductores en beta-D-glucósidos, produciendo glucosa.

**CIT**

Determinar si un microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para el metabolismo y el crecimiento con alcalinidad resultante. Ayuda a diferenciar entre géneros, en especial entre los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. La energía puede ser proporcionada a algunas bacterias en ausencia de fermentación o producción de ácido láctico por la utilización del citrato como única fuente de carbono. La permeasa de citrato permite el transporte de citrato al interior de la célula y la enzima citratasa (*citrato oxalacetato liasa*) convierte al citrato en ácido oxalacético y acetato; productos que son convertidos enzimáticamente a piruvato y dióxido de carbono.

**FOSFATASA**

Determinar la capacidad de un microorganismo de producir la suficiente enzima fosfatasa para hidrolizar el difosfato de fenolftaleína (PDP). La producción de fosfatasa se determina por la liberación de fenolftaleína, indicada por un cambio de color. La fenolftaleína liberada reacciona con un álcali para dar un color rosa a rojo brillante.

Difosfato de fenolftaleína (sal sódica)  $\xrightarrow{\text{fosfatasa}}$  Fenolftaleína libre (1)

Fenolftelína + álcali (NaOH o NH<sub>3</sub>)  $\longrightarrow$  color rosa-rojo brillante (2)

**H<sub>2</sub>S**

Determinar si ciertas bacterias heterotróficas pueden liberar enzimáticamente ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) gaseoso a partir de aminoácidos azufrados (cisteína, cistina, metionina) y otros compuestos fuentes de azufre como peptonas y tiosulfato, para producir una reacción coloreada visible de un producto negro insoluble, en presencia de un sistema indicador de H<sub>2</sub>S. Las enzimas responsables de esta prueba son la cisteína desulfhidrasa (cisteinasa) y la tiosulfato reductasa. El gas incoloro H<sub>2</sub>S reacciona con una sal fuerte de hierro, el citrato de amonio férrico, para producir un precipitado negro insoluble de sulfuro ferroso metálico.

### **LDC, ODC**

Determinar la capacidad enzimática de un microorganismo de descarboxilar un aminoácido para formar una amina con la resultante alcalinidad. De la descarboxilación de la L-lisina y L-ornitina resulta la remoción del grupo carboxilo (COOH) de los aminoácidos, para generarse las diaminas cadaverina y putrescina, respectivamente.

### **LIP**

Determinar la capacidad de microorganismos para producir la enzima lipasa, que cataliza la hidrólisis de triglicéridos y diglicéridos a ácidos grasos y glicerol. La enzima lipasa actúa sobre los ésteres emulsionados de glicéridos y/o lípidos. Los triglicéridos son hidrolizados a monoglicéridos, glicerol y una variedad de diferentes ácidos grasos saturados o no saturados. Cuando se hidrolizan, las uniones éster se rompen y elementos del agua se combinan con los fragmentos, dando paso a que los ácidos carboxílicos formados se comporten de forma insoluble en agua.

### **MNT**

Determinar la capacidad de un microorganismo de utilizar el malonato como única fuente de carbono con la resultante alcalinidad. El malonato es un inhibidor enzimático, demostrándose que el ácido malónico interfiere con la oxidación del ácido succínico a ácido fumárico, mediante la acción catalítica de la enzima succínico deshidrogenasa. El malonato inactiva la enzima por un proceso denominado inhibición competitiva.

### **OFF**

Determinar el metabolismo fermentativo de un hidrato de carbono o su falta de utilización; en este caso glucosa. La determinación de la reacción de fermentación temprana en el laboratorio ayuda en gran medida a la identificación de las bacterias anaerobias facultativas. La principal vía metabólica fermentativa de la glucosa es la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP).

### **O/129R**

Capacidad de determinadas especies para crecer en presencia del compuesto vibriostático O/129.

### **URE**

La enzima ureasa es una importante enzima microbiana relacionada con la descomposición de compuestos orgánicos. La ureasa ataca el enlace entre el carbono y nitrógeno de la urea produciendo CO<sub>2</sub>, agua y amonio donde el vire rojo/amarillo con el indicador rojo de fenol. Es considerada una enzima constitutiva debido a que es sintetizada por ciertas bacterias sin tomar en consideración la presencia o ausencia de su sustrato, la urea.

### **5KG**

Determinación de la capacidad de un microorganismo para oxidar gluconato, su única fuente de carbono.

### **BIBLIOGRAFÍA**

MacFaddin J.F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. 3<sup>a</sup> edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

bioMérieux, Inc. (2011). *User manual\_v. 410791\_VITEK 2 Systems Product Information*. Recuperado el 22 de octubre 2016 de: <http://techlib.biomerieux.com>

# ANEXO VI

## ESPECIFICACIONES *PRIMERS* EMPLEADOS EN EL PCR MULTIPLEX DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

---

Se utilizarán dos pares de *primers* específicos para la cepa *Listeria monocytogenes* denominados como *inIA* Fw (5'- ACG GGA CAA ATG CTC AGG CAG C -3'); *inIA* Rv (5'- TGC GGT TAA ACC TGC TAG GGG AC -3'); *inIC* Fw (5'- ACG AAC TCC GAG ATA CTG ACT CGC-3') e *inIC* Rv (5'- TCC CAC AGG ACA CAA CCA TCT ACA-3'). Estos *primers* codifican para las proteínas internalina A (*InIA*) e internalina C (*inIC*). Se utilizarán por su carácter altamente específico, lo cual permitirá la amplificación de los genes implicados en algunos eventos en el mecanismo de patogenicidad del microorganismo proporcionado. Las especificaciones de los *primers* se presentan en las **tablas 6.1** (*inIA*) y **6.2** (*inIC*).

**TABLA 6.1** *Primers sintetizados para el gen inIA.*

<b>Clave: <i>inIA</i> Fw</b> (gen internalina A <i>forward</i> )	<b>Longitud:</b> 22	<b>Secuencia (5'-3'):</b> ACG GGA CAA ATG CTC AGG CAG C		
<b>Coef:</b> 252.7	<b>NanoDrop A(260):</b> 52.38	<b>Volumen (μL):</b> 500	<b>OD's totales:</b> 19.07	<b>Conc. (μg/μL):</b> 1.26
<b>C+G (%):</b> 59.09	<b>Tm<sub>(1)</sub>:</b> 69.64	<b>Tm<sub>(2)</sub>:</b> 70.00	<b>p.m:</b> 7135.40	176.37 pmol/μL

<b>Clave: <i>inIA</i> Rv</b> (gen internalina A <i>reverse</i> )	<b>Longitud:</b> 23	<b>Secuencia (5'-3'):</b> TGC GGT TAA ACC TGC TAG GGG AC		
<b>Coef:</b> 254.4	<b>NanoDrop A(260):</b> 69.54	<b>Volumen (μL):</b> 500	<b>OD's totales:</b> 23.71	<b>Conc. (μg/μL):</b> 1.56
<b>C+G (%):</b> 56.52	<b>Tm<sub>(1)</sub>:</b> 69.54	<b>Tm<sub>(2)</sub>:</b> 72.00	<b>p.m:</b> 7478.60	209.21 pmol/μL

## ANEXO VI

**Tabla 6.2** Primers sintetizados para el gen *inIC*.

<b>Clave: <i>inIC</i> Fw</b> (gen internalina C <i>forward</i> )	<b>Longitud:</b> 24	<b>Secuencia (5'-3'):</b> ACG AAC TCC GAG ATA CTG ACT CGC		
<b>Coef:</b> 262.5	<b>NanoDrop A(260):</b> 59.389	<b>Volumen (μL):</b> 500	<b>OD's totales:</b> 20.98	<b>Conc. (μg/μL):</b> 1.38
<b>C+G (%):</b> 54.17	<b>Tm<sub>(1)</sub>:</b> 69.46	<b>Tm<sub>(2)</sub>:</b> 74.00	<b>p.m:</b> 7697.80	179.84 pmol/μL

<b>Clave: <i>inIC</i> Rv</b> (gen internalina C <i>reverse</i> )	<b>Longitud:</b> 24	<b>Secuencia (5'-3'):</b> TCC CAC AGG ACA CAA CCA TCT ACA		
<b>Coef:</b> 263.2	<b>NanoDrop A(260):</b> 58.683	<b>Volumen (μL):</b> 500	<b>OD's totales:</b> 20.73	<b>Conc. (μg/μL):</b> 1.37
<b>C+G (%):</b> 50.00	<b>Tm<sub>(1)</sub>:</b> 68.04	<b>Tm<sub>(2)</sub>:</b> 72.00	<b>p.m:</b> 7610.80	179.73 pmol/μL



*Métodos Microbiológicos para el Análisis de Alimentos* es una obra editada por la Facultad de Química.

La publicación de esta obra fue posible gracias al apoyo de la Coordinación de Comunicación, a través del Departamento Editorial.

El cuidado de la edición estuvo a cargo de M en C Brenda Álvarez Carreño

Diseño de portada: DG Norma Castillo Velásquez.

Diseño de interiores: Maricela Hernández Casasola.

**Publicación aprobada por el Comité Editorial  
de la Facultad de Química**

**Febrero de 2021**

## Métodos Microbiológicos para el Análisis de Alimentos

La Microbiología de alimentos es una disciplina dinámica ya que se encuentra en constante evolución e involucra diversos campos de estudio como la Bioquímica, la Biotecnología, los bioprocesos y el desarrollo de nuevos productos, sólo por mencionar algunos.

Los alimentos representan una fuente de nutrientes para todos los organismos vivos y día a día la industria alimentaria concentra esfuerzos en su producción, incluyendo las etapas de procesamiento primario, desde la selección de la materia prima, su transporte, tratamiento, empaquetado, distribución y comercialización, para así garantizar su calidad y seguridad.

La diversidad del metabolismo microbiano puede ser empleada para la producción de una gran variedad de alimentos, lo anterior, representa el aspecto benéfico de los microorganismos; y en otros casos, puede resultar en procesos de descomposición en diversas matrices alimentarias, o incluso, estos microorganismos pueden generar infecciones o intoxicaciones en los consumidores.

El conocimiento contenido en esta obra está encaminado a proporcionar al futuro Químico de Alimentos, un panorama integral sobre la función que los microorganismos tienen a lo largo de la cadena de producción, generando un criterio para la toma de decisiones, siempre basado en las disposiciones oficiales que rigen a la industria alimentaria a nivel nacional e internacional. Incluye diversas metodologías tradicionales, moleculares y alternativas de identificación microbiana que actualmente son de uso cotidiano en la industria y que podrán ser comprendidas desde su fundamento hasta su realización paso a paso en los laboratorios.

