



ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS

METODOLOGÍA ANALÍTICA OFICIAL

MICROORGANISMOS PATÓGENOS

VOLUMEN 1

Versión 1: diciembre 2011

INDICE

1. <i>Salmonella</i> spp. en alimentos.....	pág. 1
2. Detección, aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> spp. en muestras de alimentos (procedimiento según International Standard ISO 6579:2002).....	pág. 5
3. Detección, aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> spp. en muestras de alimentos (procedimiento según Bacteriological Analytical Manual – FDA: 2007).....	pág. 23
4. <i>Escherichia coli</i> O157:H7/NM en alimentos.....	pág. 55
5. Detección, aislamiento e identificación de <i>Escherichia coli</i> O157:H7/NM en productos cárnicos (procedimiento según USDA/FSIS: 2010).....	pág. 58
6. Detección de <i>Escherichia coli</i> O157:H7/NM en alimentos (procedimiento según Bacteriological Analytical Manual – FDA: 2011)..	pág. 73
7. Detección de <i>Escherichia coli</i> O157:H7/NM en alimentos. (procedimiento según International Standard ISO 16654: 2001).....	pág. 87
8. <i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos.....	pág. 101
9. Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> en productos cárnicos. (procedimiento según USDA/FSIS: 2009).....	pág. 105
10. Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> en muestras de alimentos. (procedimiento según Bacteriological Analytical Manual – FDA: 2011)..	pág. 118
11. Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> en muestras de alimentos. (procedimiento según International Standard ISO 11290-1: 2004).....	pág. 140
12. <i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> spp.) en fórmulas infantiles en polvo.....	pág. 158
13. Detección, aislamiento e identificación de <i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> spp.) en fórmulas infantiles en polvo. (procedimiento según Technical Specification ISO/TS 22964: 2006).	pág. 163

Salmonella spp. en alimentos

1. Generalidades

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Son bacilos gram negativos, de 0,7-1,5 x 2-5 µm, anaerobios facultativos, no formadores de esporas, generalmente móviles por flagelos peritricos (excepto *S. gallinarum*). Fermentan glucosa, maltosa y manitol, pero no fermentan lactosa ni sacarosa. Son generalmente catalasa positiva, oxidasa negativa y reducen nitratos a nitritos.

Son viables en diferentes condiciones ambientales, sobreviven a la refrigeración y congelación y mueren por calentamiento (mayor a los 70 °C).

El serotipo de *Salmonella* está determinado por los siguientes tres tipos de antígenos: el antígeno somático (O), el antígeno flagelar (H) y el antígeno de virulencia (Vi). Los antígenos somáticos son lipopolisacáridos componentes de la pared celular y se han identificado 60 antígenos diferentes. Los antígenos flagelares son proteínas localizadas en el flagelo móvil. El antígeno de virulencia es un polisacárido termolábil localizado en la cápsula.

Antes del 1° de Julio de 1963 se utilizaban 3 especies de *Salmonella*: *S. typhi*, *S. choleraesuis* y *S. enteritidis* y la mayoría de los serotipos pertenecían a esta última especie. En la actualidad, todas las especies y subgrupos anteriores de *Salmonella* y *Arizona* se consideran de la misma especie, pero pueden separarse en 6 subgrupos. La única excepción la constituye *S. bongori* que por estudios de hibridación de ADN se constató que es una especie distinta.

Por lo tanto, existen 2 especies y 6 subespecies de *S. entérica* en el esquema actual utilizado por el Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

a. *Salmonella entérica*:

S. entérica subespecie entérica (I): comprende la mayoría de los serotipos

S. entérica subespecie salamae (II)

S. entérica subespecie arizonae (IIIa)

S. entérica subespecie diarizonae (IIIb)

S. entérica subespecie houtenae (IV)

S. entérica subespecie indica (VI)

b. *Salmonella bongori* (antes subespecie V)

La mayoría de las serovariedades aisladas del hombre y de los animales de sangre caliente pertenecen a la subespecie I (entérica) y llevan un nombre relacionado con el lugar geográfico donde fueron aisladas.

Como las serovariedades no tienen nivel taxonómico de especie, escapan al "Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana" y por ello deben escribirse en letra tipo romano, no itálica, por ejemplo: *Salmonella entérica* subespecie entérica serovariedad Typhimurium.

Las serovariedades de las subespecies restantes y *S. bongori* se designan con el nombre de la subespecie seguido de la fórmula antigénica, por ejemplo: *Salmonella* subespecie IV 50: b:- (*S. entérica* subespecie houtenae 50: b:-).

La serotipificación es útil para definir, monitorear y controlar brotes y epidemias. Un segundo método de clasificación que se utiliza con frecuencia es el esquema de Kaufmann-White. En este esquema, varios serotipos de *Salmonella* se clasifican dentro de once serogrupos. Los mismos están basados en un antígeno mayor y uno o varios antígenos somáticos menores. Recientemente se ha desarrollado un tercer esquema de clasificación basado en las técnicas de hibridación del ADN. (1) (4) (5)

2. Características de la enfermedad

La salmonelosis es considerada una zoonosis de distribución mundial y de origen alimentario. La vía de transmisión es fecal-oral a través de alimentos y agua contaminada con heces humanas o animales, materiales y utensilios de cocina contaminados o por contacto directo de persona a persona.

Desde el punto de vista epidemiológico, puede manifestarse como casos esporádicos o brotes con un número variable de afectados. La susceptibilidad es universal.

La salmonelosis se puede presentar como una enfermedad no sistémica o gastroenteritis que se caracteriza por un período de incubación de 12 a 72 horas. Puede manifestarse en forma aguda con fiebre ligera (resuelve en 2 - 3 días), náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea durante unos días o una semana. La gravedad de los síntomas puede variar desde ligero malestar a deshidratación grave y en algunos casos pueden quedar secuelas crónicas (síntomas de artritis que pueden aparecer 3 a 4 semanas después de los síntomas agudos).

Otra manifestación clínica de la enfermedad es la sistémica, también conocida como fiebre entérica o fiebres tifoidea y paratifoidea, con una incubación de entre 3 y 56 días y síntomas de fiebre, dolor de cabeza, sensibilidad abdominal, constipación, manchas en la superficie del cuerpo de color rojo, infección del flujo biliar, hemorragias provocadas por úlceras y perforación del intestino causando peritonitis. (1) (2)

3. Epidemiología

En el período 1995-1999, *Salmonella* fue el segundo agente causal más importante (35,3%) de brotes de enfermedad transmitida por alimentos (ETA) en América Latina y el Caribe.

Durante el período 1993-2002 ocurrieron en Argentina 60 brotes de salmonelosis que produjeron 889 enfermos y 4 muertos. El 6,7 % de los brotes fue causado por *Salmonella* serovariedad Enteritidis, el 1,7% por *S. arizonae* y en el 90% de los casos no se pudo identificar la serovariedad correspondiente. Con relación a los alimentos involucrados en dichos brotes el 25% correspondió a derivados de huevo, mayonesa y carne de aves.

Según el Ministerio de Salud de la Nación el porcentaje acumulado a la semana 47 del año 2010 para las gastroenteritis por fiebre tifoidea y paratifoidea es de 22 % contra 38 % correspondiente a la misma semana del año 2009, siendo la región más afectada la del Noroeste Argentino (NOA) para ambos años. (2) (3)

4. Reservorio y fuentes de infección

Los principales reservorios de *Salmonella* son las aves de corral, el ganado bovino y el porcino. Por lo tanto, son fuentes de infección las carnes de estos animales y los huevos. El hombre también es reservorio de esta bacteria lo que revela la importancia de considerar a los manipuladores de alimentos portadores como fuente de infección. También se han identificado como fuentes de infección los vegetales frescos consumidos crudos en ensaladas.

Alimentos asociados: carnes crudas, pollo, huevos, leche y derivados lácteos, vegetales frescos, pescados, salsas y aderezos para ensaladas, mezclas para pasteles, postres a base de crema, gelatina en polvo, cacao y chocolate. (3) (4)

5. Prevención

Las principales causas de infección son los alimentos crudos o que hayan sufrido cocción insuficiente, además de la contaminación cruzada que ocurre cuando los productos cocidos entran en contacto con alimentos crudos o con superficies o materiales contaminados (como las tablas para cortar).

Por lo tanto, la cocción adecuada y la higiene durante la manipulación de los alimentos pueden prevenir en gran medida las infecciones causadas por *Salmonella*. No olvidar estos consejos a la hora de manipular alimentos:

- ✓ LIMPIAR: Lávese las manos y lave las superficies frecuentemente
- ✓ SEPARAR: No propague la contaminación
- ✓ COCINAR: Cocine hasta una temperatura adecuada
- ✓ ENFRIAR: Refrigere prontamente (2) (3)

Referencias:

1. Elmer W. Koneman (et al.) - "Diagnóstico microbiológico-texto y atlas en color", Ed. Medica Panamericana, 6° edición, 2008
2. Ministerio de Salud Nacional, www.msal.gov.ar
3. Organización Mundial de la Salud
4. Romero Cabello, Raúl - "Microbiología y Parasitología Humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias", Ed. Médica Panamericana, 3° edición, 2007
5. Caffer, M. I.; Teragno, R. - "Manual de Procedimientos para la caracterización de Salmonella", ANLIS "Dr. Carlos G. Malbran", 2000

Detección, aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. en muestras de alimentos

(Procedimiento según International Standard ISO 6579: 2002)

1. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar la detección, aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. en muestras de alimentos.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica para realizar la detección, aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. en muestras de alimentos.

La confirmación de *Salmonella* spp. se realiza por propiedades bioquímicas y serológicas.

NOTA: las cepas aisladas deben ser enviadas al Centro de Referencia Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbrán”, para una mayor tipificación.

3. DESARROLLO

3.1. Medios de cultivo, reactivos, materiales y equipos

- 3.1.1. Agua peptona bufferada (BPW)
- 3.1.2. Caldo Rappaport – Vassiliadis con soja (caldo RVS)
- 3.1.3. Caldo Müller – Kauffmann tetratoato + novobiocina (MKTTn)
- 3.1.4. Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)
- 3.1.5. Segundo medio sólido selectivo: a elección del laboratorio. Se deben seguir las instrucciones del laboratorio para su preparación
- 3.1.6. Agar nutritivo (AN)
- 3.1.7. Agar triple sugar iron (TSI)
- 3.1.8. Agar urea (según Christensen)
- 3.1.9. Caldo lisina decarboxilasa
- 3.1.10. Reactivo para la detección de β -galactosidasa (o discos siguiendo las instrucciones del fabricante)
- 3.1.11. Reactivos para la reacción de Voges-Proskauer (VP)
- 3.1.12. Reactivos para la reacción de Indol
- 3.1.13. Agar nutritivo semisólido
- 3.1.14. Solución salina fisiológica

- 3.1.15. Kit de pruebas bioquímicas capaz de identificar *Salmonella* spp. (ej. Galería API 20 E, bioMerieux)
- 3.1.16. Sueros: En el comercio hay disponible distintos tipos de sueros que contienen anticuerpos para uno o varios antígenos O. Ej.: antisueros que contienen uno o más grupos O (sueros monovalentes o polivalentes anti O), sueros anti Vi y antisueros que contienen anticuerpos para uno o varios factores H. En las pruebas de serología deben utilizarse los sueros adecuados para la detección de todos los tipos de *Salmonella*. Los sueros deben ser provistos por un proveedor reconocido y competente.
- 3.1.17. Estufa de esterilización
- 3.1.18. Autoclave
- 3.1.19. Horno o cabina de secado, ventilada por convección, capaz de operar entre 37°C y 55°C
- 3.1.20. Estufa de incubación a 37°C ± 1°C
- 3.1.21. Baño de agua o estufa de incubación a 41.5°C ± 1°C
- 3.1.22. Baño de agua capaz de operar entre 44°C a 47°C
- 3.1.23. Baño de agua a 37°C ± 1°C
- 3.1.24. Ansa de platino o níquel de aprox. 3 mm de diámetro o 10 µl.
- 3.1.25. Peachímetro calibrado con exactitud de 0.1 unidad de pH a 20°C a 25°C.
- 3.1.26. Pipetas graduadas o automáticas de 10 ml y 1 ml de capacidad nominal, graduadas en 0.5 ml y 0.1 ml respectivamente.
- 3.1.27. Tubos o frascos de capacidad apropiada.
- 3.1.28. Placa de Petri de vidrio o plástico de 90 a 100 mm de diámetro y de 140mm de diámetro.

3.2. Principio

El método está basado en las siguientes etapas:

3.2.1. Pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo: La muestra se siembra en agua peptona bufferada (BPW) a temperatura ambiente y luego se incuba a 37°C ± 1°C durante 18 h ± 2 h. Para ciertos tipos de alimentos se utilizan enriquecimientos específicos. (3.3.1.)

3.2.2. Enriquecimiento en medio líquido selectivo: La muestra obtenida en la etapa 3.2.1. se inocula en los siguientes medios líquidos:

- Caldo Rappaport - Vassiliadis con Soja (RVS): se incuba a 41.5°C ± 1°C durante 24 h ± 3 h.
- Caldo Muller - Kauffmann tetracionato/ novobiocina (MKTTn): se incuba a 37°C ± 1°C durante 24 h ± 3 h.

3.2.3. Aislamiento en medio selectivo y diferencial: Del cultivo obtenido en la etapa 3.2.2 se inoculan dos medios sólidos selectivos

- Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)
- Otro medio sólido selectivo, complementario al XLD, apropiado para el aislamiento de *Salmonella* lactosa positiva y cepas de *Salmonella* Typhi y Paratyphi. El laboratorio debe elegir el medio a utilizar.

El agar XLD se incuba a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h} \pm 3\text{h}$. El segundo medio selectivo es incubado de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Nota: Como segundo medio selectivo se puede utilizar el agar verde brillante o agar bismuto sulfito.

3.2.4. Confirmación de colonias presuntivas aisladas: Las colonias sospechosas de *Salmonella* son reaisladas y su confirmación se realiza por propiedades bioquímicas y serología.

3.3. Procedimiento

3.3.1. Preenriquecimiento

Para la preparación de la suspensión inicial se utiliza en general como diluyente Agua Peptona Bufferada (BPW).

Si la cantidad de la porción a analizar es mayor de 25 g utilizar la cantidad necesaria del diluyente de preenriquecimiento para llevar a una dilución 1/10.

NOTA: Preparación de muestras compuestas (pool)

Cuando se necesita analizar más de una porción de 25 g de un lote específico o un alimento y cuando existe evidencia disponible que la formación de pools no afecta los resultados de una muestra en particular, se pueden analizar muestras compuestas. Por ejemplo, en caso de analizar 10 muestras de 25 g, combinar las 10 muestras para formar una muestra de 250 g y agregar 2,25 l del caldo de preenriquecimiento. Alternativamente 0.1ml (en 10 ml de caldo RVS) y 1 ml (en 10 ml de MKTTn) del caldo de preenriquecimiento provenientes de 10 muestras separadas pueden ser combinadas para un enriquecimiento en 100 ml del caldo para enriquecimiento selectivo.

Enriquecimiento para chocolate y alimentos que contienen chocolate (ej. más de un 20%): agregar al BPW 50 g/l de caseína (evitar el uso de caseína ácida) o 100 g/l de leche en polvo descremada estéril. Después de 2 horas de incubación agregar 0.018 g/l de verde brillante si el alimento es sospechoso de tener una alta contaminación con flora Gram positiva.

Enriquecimiento para alimentos ácidos: asegurarse que el pH no caiga por debajo de 4.5 durante el preenriquecimiento. En este caso el pH es más estable si se utiliza agua peptona bufferada (BPW) doble concentración. Incubar el preenriquecimiento a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $18\text{h} \pm 2\text{h}$.

3.3.2. Enriquecimiento selectivo

Transferir 0.1 ml del cultivo obtenido en 3.3.1. a un tubo con 10 ml de caldo RVS e incubar a $41.5\text{C}^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h} \pm 3\text{h}$.

Transferir 1 ml del cultivo obtenido en 3.3.1. a un tubo con 10 ml de caldo MKTTn e incubar $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h} \pm 3\text{h}$.

Nota: Se recomienda utilizar baño de agua o estufa de incubación con aire forzado para asegurar que la temperatura máxima no exceda los 42.5°C.

3.3.3. Aislamiento e identificación

Tomar un ansada de los cultivos obtenidos en 3.3.2. (caldo RVS y MKTTn) y estriar en una placa de agar XLD. Utilizar las placas de Petri grandes ó 2 del menor tamaño usando el mismo ansa. Proceder de la misma manera con el segundo agar selectivo.

Incubar las placas de XLD a 37°C ± 1°C durante 24 h ± 3 h y el segundo agar selectivo de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Examinar las placas después de la incubación para la determinación de la presencia de colonias típicas de *Salmonella* y colonias atípicas que podrían ser *Salmonella* (ver nota).

Las colonias típicas de *Salmonella* en el agar XLD son transparentes, del mismo color del medio con centro negro.

Nota: las colonias de *Salmonella* H₂S negativo (ej. *S. Paratyphi* A) en el XLD son rosadas con un centro rosa oscuro y las de *Salmonella* lactosa positivas son de color amarillo con o sin centro negro.

3.3.4. Confirmación bioquímica

Para la confirmación por propiedades bioquímicas pueden utilizarse kits comerciales para los cuales deben seguirse las instrucciones del fabricante.

Para la confirmación tomar de cada placa de Petri (2 placas del menor tamaño o una del mayor tamaño) de cada medio selectivo (ver 3.3.3.) al menos una colonia típica o sospechosa de *Salmonella* y 4 colonias más si la primera es negativa.

En el caso de estudios epidemiológicos se recomienda tomar al menos 5 colonias para la confirmación. Si en algunas de las placas hay menos de 5 colonias sospechosas confirmar todas las colonias sospechosas.

Seleccionar las colonias sospechosas y estriar por agotamiento en superficie en placas de agar nutritivo para obtención de colonias aisladas. Incubar las placas a 37°C ± 1°C durante 24 h ± 3 h.

Para la confirmación bioquímica y serológica utilizar cultivos puros.

Agar TSI: con una aguja de inoculación hacer una punción en el fondo y estriar el pico de flauta. Incubar a 37°C ± 1°C durante 24 h ± 3 h.

Interpretación:

Fondo:

- amarillo: glucosa positivo
- rojo o sin cambio: glucosa negativo
- negro: formación de H₂S
- burbujas o ruptura de agar: formación de gas a partir de la glucosa

Pico de flauta:

- amarillo: lactosa y/o sucrosa positivo
- rojo o sin cambio: lactosa y sucrosa negativo.
- Las cepas típicas de *Salmonella* dan reacción alcalina (color rojo) en el pico de flauta y ácida (color amarillo) en el fondo, con formación de gas y

(en aproximadamente en el 90% de los casos) formación de H₂S (ennegrecimiento del agar).

En presencia de una *Salmonella* lactosa positiva el pico de flauta del TSI es de color amarillo. Por esto la confirmación preliminar de *Salmonella* no debe basarse solamente en los resultados del TSI.

Agar urea: Con un aguja de inoculación estriar el pico de flauta. Incubar a 37°C ± 1°C durante 24 h ± 3 h y examinar en intervalos.

Reacción positiva: por hidrólisis de la urea se libera amonio que vira el color del indicador rojo de fenol a rosa y luego a color cereza. La reacción generalmente aparece después de 2 h a 4 h.

Caldo L-Lisina decarboxilasa: a partir del cultivo puro inocular con una aguja de inoculación por debajo de la superficie del caldo. Incubar a 30°C ± 1°C durante 24 h ± 2 h.

Reacción positiva: coloración violeta

Reacción negativa: coloración amarilla

β- Galactosidasa: Utilizar discos siguiendo las instrucciones del fabricante.

Medio para Voges- Proskauer (VP): Resuspender un ansada de la colonia sospechosa en un tubo estéril con 3 ml de caldo VP, Incubar a 37°C ± 1°C durante 24 h ± 3 h después de la incubación agregar 2 gotas de la solución de creatina, 3 gotas de la solución alcohólica de 1-naftol y 2 gotas de la solución de KOH; agitar después del agregado de cada reactivo.

Medio para reacción de indol: Resuspender una ansada de la colonia sospechosa en un tubo estéril con 5 ml de caldo triptona – triptofano. Incubar a 37°C ± 1°C durante 24 h ± 3 h. Después de la incubación agregar 1 ml de reactivo de Kovacs.

Reacción positiva: formación de un anillo rojo

Reacción negativa: formación de un anillo amarillo – marrón.

Interpretación de las pruebas bioquímicas.

Test	Salmonella									
	S. Typhi		S.Paratyphi A		S.Paratyphi B		S. Paratyphi C		Otras especies	
	reacción	% ^(b)	reacción	% ^(b)	reacción	% ^(c)	reacción	% ^(c)	reacción	% ^(b)
TSI: ácido de glucosa	+	100	+	100	+		+		+	100
TSI: gas de glucosa	- ^(d)	0	+	100	+		+		+	92
TSI: ácido de lactosa	-	2	-	100	-		-		-	1
TSI: ácido de sucrosa	-	0	-	0	-		-		-	1
TSI: producción de H ₂ S	+	97	-	10	+		+		+	92
Urea	-	0	-	0	-		-		-	1
Lysina decarboxilasa	+	98	-	0	+		+		+	95
β-galactosidasa	-	0	-	0	-		-		-	2 ^(e)
VP	-	0	-	0	-		-		-	0
Indole	-	0	-	0	-		-		-	1

(b) estos porcentajes indican que no todos los aislamientos de serotipos de *Salmonella* presentan las reacciones + o – marcadas.

(c) el porcentaje no está disponible en la literatura.

(d) *Salmonella* Typhi es anaerogénica (no produce gas)

(e) *Salmonella entérica* subespecie arizonae puede ser lactosa positiva o negativa pero siempre da positiva la reacción de la β-galactosidasa. Para el estudio de estas cepas es útil realizar pruebas bioquímicas complementarias.

3.3.5. Confirmación serológica y serotipificación

3.3.5.1. General: La detección de la presencia de los antígenos O, Vi Y H de *Salmonella* se realiza por aglutinación en placa con los sueros apropiados a partir de colonias puras y después de eliminar las cepas autoaglutinables.

3.3.5.2. Eliminación de cepas autoaglutinables: colocar una gota de solución salina en una placa de vidrio, con un ansa dispersar parte de la colonia para obtener una suspensión turbia y homogénea. Mover la placa de vidrio en círculos por 30 a 60 segundos. Observar el resultado contra un fondo oscuro preferiblemente con ayuda de una lupa.

Si la cepa aglutina es considerada autoaglutinable y no debería someterse a la determinación serológica ya que los resultados no son confiables.

3.3.5.3. Determinación del antígeno O: colocar una gota del suero anti O en una placa de vidrio, con un ansa dispersar parte de la colonia para obtener una suspensión turbia y homogénea. Mover la placa de vidrio en círculos por 30 a 60 segundos. Observar el resultado contra un fondo oscuro preferiblemente con ayuda de una lupa. Si se observa aglutinación la reacción es considerada positiva.

3.3.5.4. Determinación del antígeno Vi: colocar una gota del suero anti Vi en una placa de vidrio, con un ansa dispersar parte de la colonia para obtener una

suspensión turbia y homogénea. Mover la placa de vidrio en círculos por 30 a 60 segundos. Observar el resultado contra un fondo oscuro preferiblemente con ayuda de una lupa. Si se observa aglutinación la reacción es considerada positiva.

3.3.5.5. Determinación del antígeno H: Inocular un agar nutritivo semisólido con el cultivo puro, incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$. Utilizar este cultivo para determinación del antígeno H.

Colocar una gota del suero anti H en una placa de vidrio, con un ansa dispersar parte de la colonia para obtener una suspensión turbia y homogénea. Mover la placa de vidrio en círculos por 30 a 60 segundos. Observar el resultado contra un fondo oscuro preferiblemente con ayuda de una lupa. Si se observa aglutinación la reacción es considerada positiva.

3.3.6. Interpretación de reacciones bioquímicas y serológicas

Reacciones bioquímicas	Auto-aglutinación	Reacciones serológicas	Interpretación
Típica	No	O, Vi o H positivo	Considerada <i>Salmonella</i>
Típica	No	Todas las reacciones negativas	Puede ser <i>Salmonella</i>
Típica	Si	No testado	
No típica	No/Si	O, Vi o H positivo	No es considerada <i>Salmonella</i>
No típica	No/Si	Todas las reacciones negativas	

3.3.7. Tipificación

Una vez identificado el microorganismo como *Salmonella* spp. por propiedades bioquímicas y serológicas, la cepa debe ser enviada al Centro de Referencia Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbrán”, para una mayor tipificación.

3.3.8. Expresión de los resultados

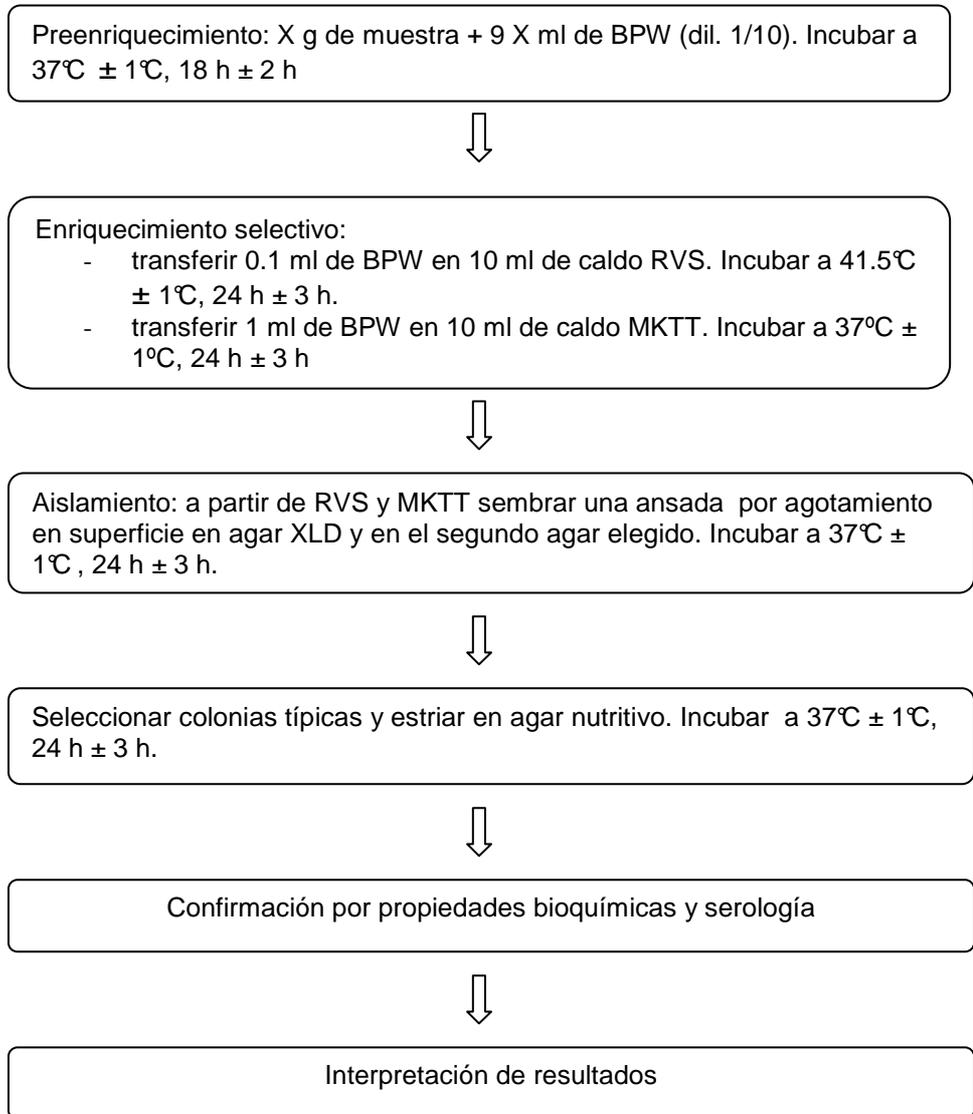
De acuerdo a los resultados de la interpretación (3.3.6) indicar presencia o ausencia de *Salmonella* en la cantidad de muestra analizada (por gramos o mililitros para muestras líquidas)

3.3.9. Control positivo

Junto con la muestra realizar un control positivo con un inóculo de una cepa de *Salmonella* spp. de referencia y proceder de la misma manera que la muestra para demostrar que el cultivo positivo es recuperado.

4. ANEXOS

ANEXO 1: Diagrama de flujo del procedimiento para la detección de *Salmonella* spp.



ANEXO 2: Medios de cultivos y reactivos

1. Agua peptona bufferada (BPW)

Peptona (enzimática) de caseína	10.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Disodio hidrógeno fosfato dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	9.0 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH_2PO_4)	1.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua, si es necesario calentar. Ajustar el pH a 7.0 ± 0.2 a 25°C . Distribuir en frascos o tubos de acuerdo a las necesidades analíticas. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

2. Caldo Rappaport – Vassiliadis con soja (caldo RVS)

2.1 Solución A

Digestivo enzimático de soja	5.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	8.0 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH_2PO_4)	1.4 g
Dipotasio hidrógeno fosfato (K_2HPO_4)	0.2 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua, si es necesario calentando aproximadamente a 70°C . La preparación debe ser realizada el mismo día de utilización del medio RVS completo.

2.2 Solución B

Cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	400.0 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver el $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada.

La solución debe ser mantenida en frasco de vidrio oscuro a temperatura ambiente hasta 2 años.

2.3 Solución C

Oxalato de verde de malaquita	0.4 mg
Agua destilada	100 ml

Disolver el oxalato de verde de malaquita en agua destilada.

La solución debe ser mantenida en frasco de vidrio oscuro a temperatura ambiente hasta 8 meses.

2.4 Medio completo

Solución A	1000 ml
Solución B	100 ml
Solución C	10 ml

Agregar a 1000 ml de la solución A, 100 ml de la solución B y 10 ml de la solución C. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor de 5.2 ± 0.2 después de la esterilización a 25°C. Dispensar en tubos en alícuotas de 10 ml. Esterilizar en autoclave a 115°C durante 15 minutos. Guardar a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Utilizar el medio el día de la preparación.

Nota: La composición final del medio es: digestivo enzimático de soja 4.5 g/l, cloruro de sodio 7.2 g/l, potasio dihidrógeno fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$) 1.44 g/l, cloruro de magnesio hexahidratado 28.6 g/l o cloruro de magnesio anhidro 13.4 g/l, oxalato de verde de malaquita 0.036 g/l.

3. Caldo Müller – Kauffmann tetrionato + novobiocina (MKTTn)

3.1. Medio base

Extracto de carne	4.3 g
Digestivo enzimático de caseína	8.6 g
Cloruro de sodio (NaCl)	2.6 g
Carbonato de calcio (CaCO_3)	38.7 g
Tiosulfato de sodio pentahidratado ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	47.8 g
Ox bilis para uso bacteriológico	4.78 g
Verde brillante	9.6 mg
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada llevando a ebullición por 5 minutos. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor de 8.2 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización.

Puede guardarse por 4 semanas a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

3.2. Solución yodo-ioduro

Yodo (KI)	20.0 g
Ioduro de potasio	25.0 g
Agua destilada	100 ml

Disolver completamente el ioduro de potasio en 10 ml de agua, luego agregar el yodo y llevar a 100 ml con agua destilada estéril. No calentar

Guardar la solución en la oscuridad y a temperatura ambiente en un envase cerrado.

3.3 Solución de novobiocina

Sal sódica de novobiocina	0.04 g
Agua destilada	5 ml

Disolver la novobiocina en agua destilada, mezclar y esterilizar por filtración. Conservar a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta 4 semanas.

3.4 Medio completo

Medio base	1000 ml
Solución de yodo – ioduro	20 ml
Solución de novobiocina	5 ml

Agregar asépticamente 5 ml de de solución de novobiocina a 1000 ml de medio base. Mezclar y agregar 20 ml de solución de yodo – ioduro. Mezclar bien. Dispensar asépticamente en tubos en alícuotas de 10 ml. Utilizar el medio el día de la preparación.

4. Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)

Extracto de levadura	3.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Xilosa	3.75 g
Lactosa	7.5 g
Sucrosa	7.5 g
L-Lisina clorhidrato	5.0 g
Tiosulfato de sodio	6.8 g
Citrato férrico amónico	0.8 g
Rojo Fenol	0.08 g
Desoxicolato de sodio	1.0 g
Agar	9 g a 18 g*
Agua destilada	1000 ml

*dependiendo de la fuerza gel del agar

Disolver los componentes en agua destilada por calentamiento con frecuente agitación hasta ebullición. Evitar sobrecalentamiento.

Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor de 7.4 ± 0.2 a 25°C .

Pasar el medio a tubos o frascos de capacidad adecuada. Calentar con frecuente agitación hasta que el agar se disuelva y llegue a ebullición. No sobrecalentar.

Preparación de las placas: enfriar en baño de agua a 44°C - 47°C , agitar y volcar en placas de Petri. Dejar solidificar.

Inmediatamente antes de usar secar cuidadosamente las placas (sin tapa y con la superficie del agar hacia abajo) en estufa entre 37°C y 55°C hasta que la superficie del agar quede seca.

Almacenar hasta 5 días a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

5. Agar Nutritivo

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	5.0 g
Agar	9 g a 18 g*
Agua	1000 ml

*dependiendo de la fuerza gel del agar

Disolver los componentes en agua destilada calentando si es necesario. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor después de la esterilización de 7.0 ± 0.2 a 25°C . Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

6. Medio triple sugar iron (TSI)

Extracto de carne	3.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Peptona	20.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Lactosa	10.0 g
Sacarosa	10.0 g
Glucosa	1.0 g
Citrato de hierro (III)	0.3 g
Tiosulfato de sodio	0.3 g
Rojo fenol	0.024 g
Agar	8.0 g a 18.0 g *
Agua destilada	1000 ml

*dependiendo de la fuerza gel del agar

Disolver los componentes en agua destilada llevando a ebullición. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor después de la esterilización de 7.4 ± 0.2 a 25°C . Fraccionar 10 ml del medio en tubos de 18 mm x 160 mm. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Dejar los tubos tendidos para obtener agar en pico de flauta con un fondo de 2.5 cm a 5 cm de profundidad.

7. Medio Urea agar (según Christensen)

7.1 Medio base

Peptona	1.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Glucosa	1.0 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH_2PO_4)	2.0 g
Rojo fenol	0.012 g
Agar	9.0 g a 18.0 g *
Agua destilada	1000 ml

*dependiendo de la fuerza gel del agar

Disolver los componentes en agua destilada calentando si es necesario. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor de 6.8 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

7.2 Solución de urea

Urea	400 g
Agua destilada	Hasta vol. final de 1000 ml

Disolver la urea en agua. Esterilizar por filtración.

7.3 Medio completo

Solución de Urea (7.2)	50 ml
Medio base (7.1)	950 ml

En condiciones asépticas agregar la solución de urea al medio base previamente fundido y enfriado a 44°C a 47°C. Fraccionar en tubos estériles 10 ml. Dejar solidificar en inclinación para obtener agar en pico de flauta.

8. Medio para L-Lisina decarboxilasa

L-Lisina monohidrato ($C_6H_{14}N_2O_2 \cdot HCl$)	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Glucosa ($C_6H_{12}O_6$)	1.0 g
Púrpura de bromocresol	0.015 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua, calentando si es necesario. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor de 6.8 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Fraccionar 5 ml del medio en tubos de 18 mm x 160 mm. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

9. β – Galactosidasa

9.1 Solución Buffer

Sodio dihidrógeno fosfato (NaH_2PO_4)	6.9 g
Hidroxido de Na, solución 10 mol/l solución	3.0 ml
Agua destilada para volumen final de	50 ml

Disolver el sodio dihidrógeno fosfato en aproximadamente 45 ml de agua en frasco volumétrico. Ajustar el pH a 7.0 ± 0.2 a 25°C con solución de hidróxido de sodio. Agregar agua para llevar a volumen final de 50 ml.

9.2 Solución de ONPG

O - Nitrofenil β -D-galactopiranosido (ONPG)	0.08 g
Agua destilada	15 ml

Disolver el ONPG en agua a 50°C aproximadamente. Enfriar la solución.

9.3 Reactivo completo

Solución buffer	5 ml
Solución de ONPG (NaCl)	15 ml

Agregar la solución buffer a la solución de ONPG.

10. Reactivos para la reacción de Voges-Proskauer (VP)

10.1 Medio base

Peptona	7.0 g
Glucosa	5.0 g
Dipotasio hidrógeno fosfato (K_2HPO_4)	5.0 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua, calentando si es necesario. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor de 6.9 ± 0.2 a $25^\circ C$ después de la esterilización. Fraccionar 3 ml del medio en tubos. Esterilizar a $121^\circ C$ durante 15 minutos.

10.2 Solución alcohólica de 1- naftol

1-Naftol	6.0 g
Etanol 96%	100ml

Disolver el 1-Naftol en alcohol.

10.3 Solución de creatina (N-amidinosarcosine)

Creatina monohidrato	0.5 g
Agua destilada	100ml

Disolver la creatina monohidrato en agua

10.4 Solución de hidróxido de potasio

Hidróxido de potasio	40.0 g
Agua destilada	100ml

Disolver el hidróxido de potasio en agua.

11. Reactivos para la reacción de Indol

11.1 Caldo triptona - triptofano

Triptona	10.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
DL-Triptofano	1.0 mg
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua hirviendo. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor de 7.5 ± 0.2 a $25^\circ C$ después de la esterilización. Fraccionar 5 ml del medio en tubos. Esterilizar a $121^\circ C$ durante 15 minutos.

11.2 Reactivo de Kovacs

Alcohol amílico o isoamílico	150 ml
p-dimetilamino-benzaldehído	10.0 g
Acido clorhídrico concentrado (HCl)	50 ml

Disolver el aldehído en el alcohol. Agregar lentamente el ácido a la mezcla aldehído-alcohol.

Proteger de la luz en un frasco de vidrio de color marrón y guardar en refrigeración a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

El reactivo debe mantener un color de amarillo a marrón claro libre de precipitado.

12. Agar nutritivo semisólido

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	5.0 g
Agar	4.0 g a 9.0 g*
Agua destilada	1000 ml

*dependiendo de la fuerza gel del agar

Disolver los componentes en agua, calentando si es necesario. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor de 7.0 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

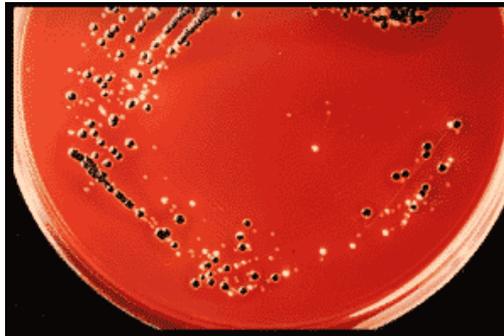
13. Solución salina fisiológica

Cloruro de sodio (NaCl)	8.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver el NaCl en agua destilada llevando a ebullición. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor después de la esterilización de 7.0 ± 0.2 a 25°C . Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

ANEXO 3: FOTOS

1. Agar Xilosa Lisina Desoxicolato



Salmonella spp.: colonias típicas transparentes, del mismo color del medio con centro negro.

2. Agar Xilosa Lisina Desoxicolato



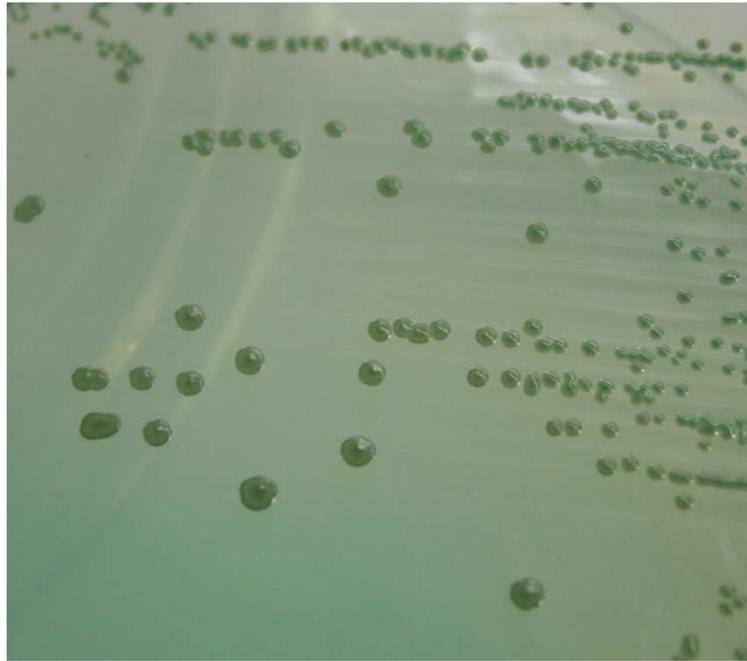
Salmonella Choleraesuis: colonias típicas transparentes, del mismo color del medio, sulfhídrico negativo.

3. Agar Bismuto Sulfito



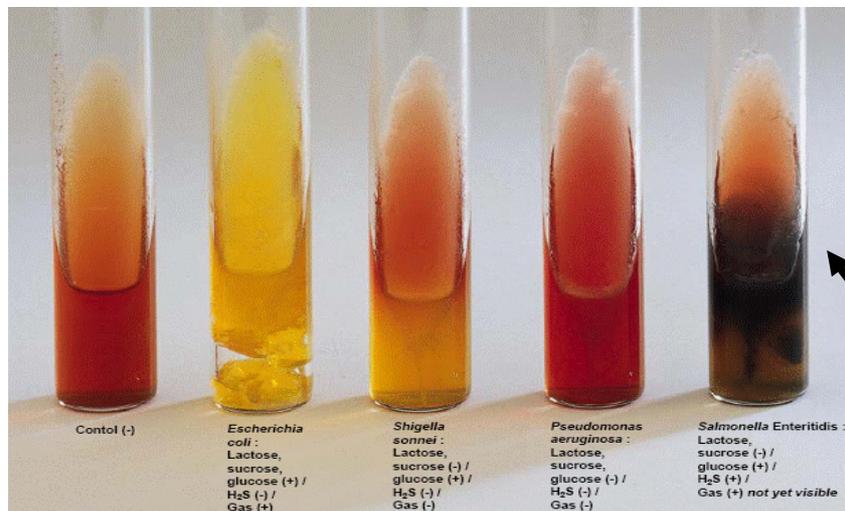
Salmonella Thypi: colonias negras con brillo metálico, rodeadas por un halo negro.

4. Agar Bismuto Sulfito



Salmonella Choleraesuis: colonias verdosas.

5. Agar TSI



Salmonella Enteritidis: TSI

5. REFERENCIAS

International Standard. ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Fourth edition 2002-07-15.

Detección, aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. en muestras de alimentos

(Procedimiento según Bacteriological Analytical Manual – FDA: 2007)

1. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar la detección, aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. en muestras de alimentos.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica para realizar la detección, aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. en muestras de alimentos.

La confirmación de *Salmonella* spp. se realiza por propiedades bioquímicas y serológicas.

NOTA: las cepas aisladas deben ser enviadas al Centro de Referencia Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbrán”, para una mayor tipificación.

3. DESARROLLO

3.1. Medios de cultivo, reactivos, materiales y equipos

- 3.1.1. Caldo lactosa (CL)
- 3.1.2. Leche descremada en polvo (reconstituida)
- 3.1.3. Caldo tetrionato (TT)
- 3.1.4. Caldo Rappaport – Vassiliadis (RV) debe ser preparado desde sus ingredientes individuales, no son aceptables las formulaciones comerciales
- 3.1.5. Caldo selenito cistina (SC)
- 3.1.6. Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)
- 3.1.7. Agar Hektoen Entérico (HE)
- 3.1.8. Agar bismuto sulfito (BS)
- 3.1.9. Agar nutritivo (AN)
- 3.1.10. Caldo triptona (triptofano) al 1%
- 3.1.11. Caldo tripticasa soja
- 3.1.12. Caldo tripticasa soja con sulfato ferroso
- 3.1.13. Caldo tripticasa soja-triptosa
- 3.1.14. Caldo rojo de metilo – Voges Proskauer (MR-VP)
- 3.1.15. Agar triple sugar iron (TSI)
- 3.1.16. Agar citrato de Simmons

- 3.1.17. Caldo urea
- 3.1.18. Caldo malonato
- 3.1.19. Caldo lisina decarboxilasa
- 3.1.20. Agar lisina hierro.
- 3.1.21. Medio para test movilidad (agar semisólido)
- 3.1.22. Caldo cianuro de potasio (KCN)
- 3.1.23. Caldo rojo fenol para carbohidratos
- 3.1.24. Caldo púrpura de bromo cresol para carbohidratos
- 3.1.25. Agar MacConkey
- 3.1.26. Caldo nutritivo
- 3.1.27. Caldo cerebro corazón infusión (BHI)
- 3.1.28. Agar base triptosa sangre
- 3.1.29. Caldo de preenriquecimiento Universal
- 3.1.30. Caldo de preenriquecimiento Universal (sin citrato férrico amoniacal)
- 3.1.31. Agua peptona bufferada (BPW)
- 3.1.32. Sulfato de potasio anhidro
- 3.1.33. Solución clorinada 200 ppm conteniendo sulfato dodecil de sodio al 0.1%
- 3.1.34. Etanol 70%
- 3.1.35. Solución de verde brillante al 1%
- 3.1.36. Solución de púrpura de bromo cresol al 0.2 %
- 3.1.37. Indicador rojo de metilo
- 3.1.38. Tergitol aniónico 7
- 3.1.39. Triton X-100
- 3.1.40. Solución salina 0.85%
- 3.1.41. Solución salina fisiológica formolada
- 3.1.42. Reactivos para la reacción de Voges-Proskauer (VP)
- 3.1.43. Reactivos para la reacción de indol
- 3.1.44. Agar nutritivo semisólido
- 3.1.45. Sueros para *Salmonella*: antisuero somático polivalente (O), antisuero flagelar polivalente (H), antisueros somáticos (O) grupo: A, B, C₁, C₂, C₃, D₁, D₂, E₁, E₂, E₃, E₄, F, G, H, I, Vi y otros grupos cuando sea apropiado
- 3.1.46. Autoclave
- 3.1.47. Horno o cabina de secado, ventilada por convección, capaz de operar entre 37°C y 55°C
- 3.1.48. Estufa de incubación a 35°C ± 2°C
- 3.1.49. Baño de agua con circulación y termostáticamente controlado a 43°C 0.2°C
- 3.1.50. Baño de agua con circulación y termostáticamente controlado a 42°C ± 0.2°C
- 3.1.51. Baño de agua a 49°C ± 1°C
- 3.1.52. Balanza con capacidad de 2000 g y sensibilidad de 0.1 g
- 3.1.53. Balanza con capacidad de 120 g y sensibilidad de 5 mg
- 3.1.54. Agitador tipo vortex
- 3.1.55. Lámpara para observar reacciones serológicas
- 3.1.56. Aguja de inoculación y ansa de platino o níquel de aprox. 3 mm de diámetro o 10 µl.
- 3.1.57. Espátula de Drigalsky

- 3.1.58. Peachímetro calibrado con exactitud de 0.1 unidad de pH a 20°C a 25°C.
- 3.1.59. Pipetas graduadas o automáticas: de 1 ml con graduación de 0.01 ml, de 5 ml y 10 ml con graduación de 0.1 ml.
- 3.1.60. Tubos y frascos de capacidad apropiada.
- 3.1.61. Placas de Petri de vidrio o plástico de 15 x 100 mm

3.2. Principio

El método está basado en las siguientes etapas:

- 3.2.1. Pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo
- 3.2.2. Enriquecimiento en medio líquido selectivo
- 3.2.3. Aislamiento en medio selectivo y diferencial
- 3.2.4. Confirmación de colonias presuntivas aisladas: Las colonias sospechosas de *Salmonella* son reaisladas y su confirmación se realiza por propiedades bioquímicas y serología.

3.3. Procedimiento

3.3.1. Preenriquecimiento

Preparación de la muestra

El siguiente método está basado en el análisis de unidades analíticas de 25 g en una dilución de 1:9, el volumen del diluyente depende del tamaño de la muestra compuesta (pool). Mantener la dilución 1:9 a menos que se de otra especificación.

- 1. Procedimiento para huevos enteros, yema de huevo y clara de huevo desecados, leche líquida (entera, descremada, con 2% de grasas y suero), mezclas de polvo para preparaciones de (tortas, galletas, bizcochos, pan, etc.), fórmulas infantiles y de alimentación oral y parenteral que contengan huevo.**

Si el alimento es congelado, descongelar una porción conveniente tan rápidamente como sea posible para minimizar el crecimiento de microorganismos de la flora acompañante. Descongelar a 45°C durante 15 minutos con agitación continua en baño de agua termostáticamente controlado o descongelar durante 18 h entre 2°C y 5°C.

Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un recipiente estéril de boca ancha o en otro recipiente apropiado y agregar 225 ml de caldo lactosa (CL). Agitar suavemente hasta disolución sin grumos.

Dejar 60 minutos \pm 5 minutos a temperatura ambiente, mezclar bien por agitación y determinar el pH con papel indicador. Si es necesario ajustar el pH a 6.8 ± 0.2 con NaOH 1N ó HCl 1N. Incubar 24 h \pm 2 h a 35°C.

2. Leche en polvo entera y descremada

Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un recipiente estéril de boca ancha o en otro recipiente apropiado y agregar 225 ml de solución de agua con verde brillante. Alternativamente unidades analíticas de 25 g pueden ser compuestas para formar un pool, en ese caso agregar la cantidad necesaria de solución de agua con verde brillante para llevar a dilución 1: 9.

NOTA: Preparar la solución de agua con verde brillante agregando 2 ml de una solución de Verde Brillante al 1 % a 1000 ml de agua destilada estéril.

Dejar 60 minutos \pm 5 minutos a temperatura ambiente e Incubar 24 h \pm 2 h a 35°C.

NOTA: Para leche entera no realizar muestras compuestas.

3. Caseína

Caseína láctica: Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un recipiente estéril de boca ancha o en otro recipiente apropiado y agregar 225 ml de caldo de preenriquecimiento Universal. Unidades analíticas de 25 g pueden ser compuestas. Dejar 60 \pm 5 minutos a temperatura ambiente e incubar 24 h \pm 2 h a 35°C.

Caseína de cuajo: Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un recipiente estéril de boca ancha o en otro recipiente apropiado y agregar 225 ml de caldo lactosa. Unidades analíticas de 25 g pueden ser compuestas. Dejar 60 minutos \pm 5 minutos a temperatura ambiente e incubar 24 h \pm 2 h a 35°C.

Caseinato de sodio: Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un recipiente estéril de boca ancha o en otro recipiente apropiado y agregar 225 ml de caldo lactosa. Mezclar bien. Unidades analíticas de 25 g pueden ser compuestas Dejar 60 minutos \pm 5 minutos a temperatura ambiente, mezclar bien por agitación y determinar el pH con papel indicador. Si es necesario ajustar el pH a 6.8 \pm 0.2 con NaOH 1N ó HCl 1N. Incubar 24 h \pm 2 h a 35°C.

4. Harina de soja

Examinar como caseinato de sodio, excepto que unidades analíticas de 25 g no pueden ser compuestas

5. Productos con huevo (fideos en general), queso, ensaladas preparadas (jamón, huevo, atún, pavo), pescado, frutas secas o congeladas, vegetales, crustáceos (langostino, cangrejo, camarones, langosta) y pescados

Preferiblemente no descongelar las muestras antes del análisis. Si se debe descongelar realizarlo a 45°C durante menos de 15 minutos con agitación continua en baño de agua termostáticamente controlado o descongelar durante 18 h entre 2°C y 5°C.

Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un recipiente estéril de boca ancha o en otro recipiente apropiado y agregar 225 ml de Caldo Lactosado.

Dejar 60 minutos \pm 5 minutos a temperatura ambiente, mezclar bien por agitación y determinar el pH con papel indicador. Si es necesario ajustar el pH a 6.8 ± 0.2 Incubar 24 h \pm 2 h a 35°C.

6. Caramelos y recubrimiento de caramelo (incluyendo chocolate)

Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un recipiente estéril de boca ancha o en otro recipiente apropiado y agregar 225 ml de leche descremada en polvo reconstituida y mezclar por 2 minutos

Dejar 60 minutos \pm 5 minutos a temperatura ambiente, mezclar bien por agitación y determinar el pH con papel indicador. Si es necesario ajustar el pH a 6.8 ± 0.2 Agregar 0.45 ml de solución acuosa de Verde Brillante al 1%. Incubar 24 h \pm 2 h a 35°C.

7. Carnes, sustitutos de carne, sustancias de origen animal, productos glandulares y harinas (de pescado, carne, hueso)

Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un recipiente estéril de boca ancha o en otro recipiente apropiado y agregar 225 ml de caldo lactosa y mezclar 2 minutos.

Dejar 60 minutos \pm 5 minutos a temperatura ambiente, mezclar bien por agitación y determinar el pH con papel indicador. Si es necesario ajustar el pH a 6.8 ± 0.2 Agregar como máximo 2.25 ml de Tergitol Aniónico 7 calentado a baño maría (15 minutos) y mezclar bien. Alternativamente utilizar Tritón X-100 precalentado en baño maría (15 minutos). Usar la mínima cantidad para formar espuma. La cantidad dependerá de la composición del alimento. Incubar 24 h \pm 2 h a 35°C.

8. Jugo de naranja (pasteurizado y sin pasteurizar), sidra de manzana (pasteurizada y sin pasteurizar) y jugo de manzana pasteurizado

Agregar 25 ml de la muestra en un recipiente estéril de boca ancha o en otro recipiente apropiado y agregar 225 ml de caldo de preenriquecimiento Universal. Mezclar suavemente. Dejar 60 minutos \pm 5 minutos a temperatura ambiente. No ajustar el pH. Incubar 24 h \pm 2 h a 35°C.

9. Tomates

Para tomates cortados pesar asépticamente 25 g de la muestra en un recipiente estéril de boca ancha o en otro recipiente apropiado y agregar 225 ml de agua peptona bufferada (BPW) y mezclar por 2 minutos.

Dejar 60 minutos \pm 5 minutos a temperatura ambiente, mezclar bien por agitación y determinar el pH con papel indicador. Si es necesario ajustar el pH a 6.8 ± 0.2 Incubar 24 h \pm 2 h a 35°C.

Para tomates enteros, no enjuagar si hay suciedad visible, examinar los tomates "tal cual". Colocar el tomate en una bolsa plástica estéril y agregar la cantidad necesaria de Caldo de preenriquecimiento Universal para que el tomate flote, generalmente el volumen es 1 peso del tomate (por ejemplo si el tomate pesa 300 g se necesitan aproximadamente 300 ml del caldo de

preenriquecimiento para que el tomate flote). Dejar 60 minutos \pm 5 minutos a temperatura ambiente, no ajustar el pH. Incubar 24 h \pm 2 h a 35°C.

10. Melón

Preferiblemente no descongelar las muestras antes del análisis. Si se debe descongelar realizarlo a 45°C durante menos de 15 minutos con agitación continua en baño de agua termostáticamente controlado o descongelar durante 18 h entre 2°C y 5°C.

Para melón cortado pesar asépticamente 25 g de la muestra en un recipiente estéril de boca ancha o en otro recipiente apropiado y agregar 225 ml de caldo de preenriquecimiento Universal y mezclar por 2 minutos.

Dejar 60 minutos \pm 5 minutos a temperatura ambiente, no ajustar el pH, mezclar bien por agitación, dejar la tapa del frasco floja e incubar 24 h \pm 2 h a 35°C.

Para melones enteros, no enjuagar si hay suciedad visible, examinar los melones "tal cual". Colocar el melón en una bolsa plástica estéril y agregar la cantidad necesaria de caldo de preenriquecimiento Universal para que el melón flote, generalmente el volumen es 1.5 peso del melón (por ejemplo si el melón pesa 1500 g se necesitan aproximadamente 2250 ml del caldo de preenriquecimiento para que el melón flote). Dejar 60 minutos \pm 5 minutos a temperatura ambiente, no ajustar el pH. Incubar la bolsa sin cerrar totalmente, 24 h \pm 2 h a 35°C.

NOTA: Para otros alimentos como huevos, levadura deshidratada, especias, coco, gelatina, ancas de rana, carcasas de conejo, goma guar, mango, alfalfa referir a la técnica *Salmonella* FDA-BAM: 2007, capítulo 5 (<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>)

3.3.2. Enriquecimiento selectivo

3.3.2.1. Mezclar bien las muestras incubadas.

- Para goma guar y alimentos sospechosos de contaminación con *S. Typhi*: transferir 1 ml del caldo de enriquecimiento a 10 ml de caldo selenito cistina (SC) y 1 ml del caldo de enriquecimiento a 10 ml de caldo tetrionato. Mezclar en vórtex.
- Para otros alimentos transferir 0.1 ml del caldo de enriquecimiento a 10 ml de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) y 1 ml del caldo de enriquecimiento a 10 ml de caldo tetrionato (TT). Mezclar en vórtex.

3.3.2.2. Incubar los caldos de enriquecimiento selectivo de la siguiente manera:

- Para alimentos con alta carga microbiana: incubar el caldo RV 24 h \pm 2 h a 42°C \pm 0.2°C (en baño de agua con circulación y termostáticamente controlado). Incubar el caldo TT 24 h \pm 2 h a 43°C \pm 0.2°C (en baño de agua con circulación y termostáticamente controlado)

- Para alimentos con baja carga microbiana: incubar el caldo RV 24 h \pm 2 h a 42°C \pm 0.2°C (en baño de agua con circulación y termostáticamente controlado). Incubar el caldo TT 24 h \pm 2 h a 35°C \pm 2°C
- Para goma guar y alimentos sospechosos de contaminación con *S. Typhi*: incubar el caldo SC y el caldo TT 24 h \pm 2 h a 35°C \pm 2°C

3.3.3. Aislamiento en medios selectivos

Mezclar los tubos en vórtex y a partir de los caldos TT y RV estriar un ansa llena (10 ul) en agar Bismuto sulfito (BS), en agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y en agar Hektoen Entérico (HE).

Para goma guar y alimentos sospechosos de contaminación con *S. Typhi* realizar lo mismo a partir del caldo (CS).

NOTA: preparar el agar BS el día antes de utilizarlo y almacenarlo en la oscuridad a temperatura ambiente.

Incubar las placas a 24 h \pm 2 h a 35°C.

Examinar las placas después de la incubación para la determinación de la presencia de colonias típicas de *Salmonella*.

Picar 2 o más colonias sospechosas de cada uno de los agares selectivos.

Las colonias sospechosas se ven de la siguiente manera:

Morfología de colonias típicas:

- Agar Hektoen Entérico (HE): colonia azul verdosa a azul con o sin centro negro. Muchas cepas de *Salmonella* pueden dar colonias con centros negros grandes y brillantes o pueden dar colonias completamente negras.
- Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD): colonia rosas con o sin centro negro. Muchas cepas de *Salmonella* pueden dar colonias con centros negros grandes y brillantes o pueden dar colonias completamente negras.
- Agar bismuto sulfito (BS): colonia marron gris o negra, algunas veces pueden tener brillo metálico. Alrededor de las colonias aparece una coloración marrón al principio que puede pasar a negra con mayor tiempo de incubación.

Si hay crecimiento de colonias típicas en el agar BS a las 24 h de incubación picar 2 colonias. Independientemente si hay o no colonias reincubar el agar BS 24 h más. Después de 48 h de incubación picar 2 o más colonias típicas. Sólo si las colonias picadas del agar BS a las 24 h dan una reacción atípica en el TSI y LIA se puede descartar el cultivo por no ser *Salmonella*.

Morfología de colonias atípicas:

En ausencia de colonias típicas de *Salmonella* investigar las colonias atípicas de la siguiente manera:

- Agar HE y Agar XLD: algunas cepas atípicas de *Salmonella* pueden producir colonias amarillas con o sin centros negros. Picar 2 o más colonias atípicas.
- Agar BS: algunas cepas atípicas producen colonias verdes con un poco o sin oscurecimiento alrededor del medio. Si no hay colonias típicas en

el agar BS después de 24 h \pm 2 h de incubación, no picar colonias y reincubar el medio 24 h más. Si no hay colonias típicas después de las 48 h \pm 2 h de incubación, entonces picar 2 o más colonias atípicas.

Controles de cultivos recomendados

Además de un cultivo de control positivo (*Salmonella* típica), se recomiendan utilizar tres cultivos adicionales para ayudar a la identificación de colonias de *Salmonella* atípica en los medios selectivos. Estos cultivos son: *S. diarizonae* (ATCC 12325) lactosa positiva y H₂S positivo, *S. abortus equi* (ATCC 9842) lactosa negativa y H₂S negativo o *S. diarizonae* (ATCC 29934) lactosa positiva y H₂S negativo. Estos cultivos pueden obtenerse en la American Type Culture Collection (ATCC).

3.3.4 Identificación Bioquímica

3.3.4.1. **TSI y LIA:** Picar suavemente el centro de la colonia con aguja de inoculación e inocular el TSI por punción en el fondo y estriar el pico de flauta. Sin flamear inocular el LIA por punción en el fondo 2 veces y estriar el pico de flauta. Como la reacción de la lisina decarboxilasa es estrictamente anaeróbica, el LIA debe tener un fondo profundo (4 cm). Guardar las placas a 5°C - 8°C. Incubar TSI y LIA a 35°C durante 24 h \pm 2 h. Tapar los tubos sin apretar para mantener condiciones de aerobiosis y prevenir la excesiva producción de H₂S.

Interpretación:

Las cepas de *Salmonella* típica producen:

En TSI: pico de flauta alcalino (rojo) y fondo ácido (amarillo) con o sin producción de H₂S (ennegrecimiento del agar)

En LIA: fondo alcalino (violeta). Considerar sólo amarillo definido en el fondo del tubo como ácido (reacción negativa). No descartar los cultivos que producen decoloración en el fondo del tubo basándose solo en esta reacción. La mayoría de los cultivos de *Salmonella* producen H₂S en LIA. Algunos cultivos que no son *Salmonella* producen un color rojo ladrillo en LIA.

Deben ser retenidos para confirmación bioquímica y serológica los cultivos que dan:

- Fondo alcalino (violeta) en LIA sin importar la reacción en TSI
- Fondo ácido (amarillo) en LIA y pico de flauta alcalino (rojo) y fondo ácido (amarillo) en TSI.

Descartar como no *Salmonella* los cultivos que dan fondo ácido en LIA y pico de flauta y fondo ácidos en TSI.

Realizar las pruebas de identificación bioquímica y serológica a:

Tres TSI presuntivos provenientes de placas sembradas a partir del caldo RV (o del caldo SC para goma guar) y tres TSI presuntivos provenientes de placas sembradas a partir del caldo TT.

3.3.4.2. **Urea:** Sembrar a partir del TSI presuntivo en tubos con caldo urea. Incubar 24 h \pm 2 h a 35°C.

3.3.4.3. **Urea rápida opcional:** Transferir 2 ansadas llenas a partir del TSI presuntivo a tubos con caldo urea rápido. Incubar 2 h a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ en baño de agua. Descartar todos los cultivos que den reacción positiva.

3.3.4.4. **Caldo lisina decarboxilasa:** Se realiza en el caso de tener un resultado dudoso en LIA. Si el cultivo dio una reacción satisfactoria en LIA no es necesario realizar esta prueba.

Sembrar el caldo con una pequeña cantidad de cultivo a partir del TSI sospechoso, ajustar bien la tapa e incubar $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ a 35°C y examinar a intervalos de 24 h. *Salmonella* da una reacción alcalina indicada por una coloración violeta. Una reacción negativa es indicada por coloración amarilla en el medio. Si el medio aparece descolorido (ni violeta ni amarillo) agregar unas gotas de púrpura de bromo cresol al 0.2%.

3.3.4.5. **Caldo dulcitol:** Sembrar el caldo con una pequeña cantidad de cultivo a partir del TSI sospechoso, cerrar la tapa sin apretar e incubar $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ a 35°C y examinar a intervalos de 24 h. La mayoría de las especies de *Salmonella* dan una reacción positiva indicada por producción de gas en la campanita y producción de ácido (coloración amarilla). Una reacción negativa está indicada por ausencia de gas en la campanita de fermentación y coloración roja (con indicador rojo fenol) o violeta (con indicador púrpura de bromo cresol).

3.3.4.6. **Caldo triptona o triptofano:** Inocular el caldo con una pequeña cantidad de cultivo a partir del TSI sospechoso. Incubar $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ a 35°C y proceder de la siguiente manera:

- **Caldo cianuro de potasio (KCN):** transferir una ansada llena a partir del cultivo de 24 h en caldo triptófano al caldo KCN, tapar con tapón de corcho y sellar con parafina. Incubar $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ a 35°C y examinar a intervalos de 24 h. Interpretar presencia de crecimiento (indicado por turbidez) como positivo. La mayoría de las especies de *Salmonella* no crecen en este medio, indicado por ausencia de turbidez.
- **Caldo malonato:** transferir una ansada llena a partir del cultivo de 24 h en caldo triptona al caldo malonato. Incubar $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ a 35°C y examinar a intervalos de 24 h. La mayoría de las especies de *Salmonella* dan una reacción negativa (sin cambio de color o coloración verde). Una reacción positiva está indicada por coloración azul.
- **Indol:** transferir 5 ml a partir del cultivo de 24 h en caldo triptófano a un tubo vacío. Agregar 0.2 – 0.3 ml de reactivo de Kovacs. La mayoría de las especies de *Salmonella* dan una reacción negativa. Una reacción positiva está indicada por formación de color rojo fuerte en la superficie. Registrar coloración naranja o rosa como +/-.

3.3.4.7 **Pruebas bioquímicas adicionales:** Realizar las siguientes pruebas para los cultivos que no dan una reacción típica para *Salmonella* con las pruebas bioquímicas descritas en los puntos 3.3.4.1 a 3.3.4.6.

Caldo lactosa rojo fenol o caldo lactosa púrpura: Inocular el caldo con una pequeña cantidad de cultivo a partir del TSI sin clasificar. Incubar 48 h \pm 2 h a 35°C pero examinar a intervalos de 24 h.

La mayoría de las especies de *Salmonella* dan una reacción negativa indicada por ausencia de gas en la campanita de fermentación y coloración roja (con indicador rojo fenol) o violeta (con indicador púrpura de bromo cresol).

Una reacción positiva está indicada por producción de gas en la campanita y producción de ácido (coloración amarilla).

Descartar como no *Salmonella* los cultivos que dan una reacción positiva para el test de lactosa, excepto los cultivos que dan reacción ácida en el pico de flauta del TSI y reacción positiva en LIA o cultivos que dan reacción positiva para malonato. Realizar más pruebas bioquímicas para determinar si se trata de *Salmonella arizonae*.

Caldo sucrosa rojo fenol o caldo sucrosa púrpura de bromocresol: Inocular el caldo con una pequeña cantidad de cultivo a partir del TSI sin clasificar. Incubar 48 h \pm 2 h a 35°C pero examinar a intervalos de 24 h.

Descartar como no *Salmonella* los cultivos que dan una reacción positiva para el test de sucrosa, excepto los cultivos que dan reacción ácida en el pico de flauta del TSI y reacción positiva en LIA.

Caldo MR-VP: Inocular el caldo con una pequeña cantidad de cultivo a partir del TSI sin clasificar. Incubar 48 h \pm 2 h a 35°C pero examinar a intervalos de 24 h.

Voges Proskauer (VP): Transferir 1 ml del cultivo de 24 h a un tubo test e incubar el sobrante del caldo MR-VP 48 h más a 35°C. Agregar 0.6 ml de α -naftol y mezclar bien. Agregar 0.2 ml de solución de KOH al 40% y mezclar. Para acelerar e intensificar la reacción agregar unos cristales de creatina. Leer la reacción después de 4 h: una reacción positiva está indicada por coloración rosa a rojo rubí. La mayoría de las especies de *Salmonella* dan una reacción negativa indicada por ausencia de desarrollo de color.

Rojo de metilo (MR): a 5 ml del caldo MR-VP de 96 h agregar 5 a 6 gotas de indicador rojo de metilo. Leer inmediatamente. La mayoría de las especies de *Salmonella* dan una reacción positiva indicada por desarrollo de color rojo.

Descartar como no *Salmonella* los cultivos que dan reacción positiva para KCN y VP y reacción negativa para rojo de metilo.

Agar citrato de Simmons: Inocular con cultivo a partir del TSI sin clasificar. Estriar con aguja el pico de flauta. Incubar 96 h \pm 2 h a 35°C.

Una reacción positiva está indicada por presencia de crecimiento, usualmente acompañado por cambio de color del verde al azul. La mayoría de las especies de *Salmonella* son citrato positivo.

Una reacción negativa está indicada por ausencia o muy poco crecimiento y sin cambio de color.

NOTA: Como alternativa de las pruebas bioquímicas convencionales en tubo se pueden utilizar kits comerciales (ej.: API 20E bioMerieux, Enterotube II, Enterobacteriaceae II, MICRO-ID, Vitek GNI).

3.3.5. Confirmación serológica y serotipificación

General: La detección de la presencia de los antígenos O, Vi Y H de *Salmonella* se realiza por aglutinación en placa con los sueros apropiados a partir de colonias puras y después de eliminar las cepas autoaglutinables.

3.3.5.1. Eliminación de cepas autoaglutinables: colocar una gota de solución salina en una placa de vidrio. Con un ansa dispersar parte de la colonia para obtener una suspensión turbia y homogénea. Mover la placa de vidrio en círculos por 30 a 60 segundos. Observar el resultado contra un fondo oscuro preferiblemente con ayuda de una lupa.

Si la cepa aglutina es considerada autoaglutinable y no debe someterse a la determinación serológica, ya que los resultados no son confiables.

3.3.5.2. Determinación del antígeno somático O:

Antisuero polivalente (O): emulsionar una ansada de cultivo de 24 h - 48 h tomado a partir del pico de flauta del TSI o preferiblemente del triptosa agar sangre base (sin sangre) con 2 ml de solución salina 0.85% y colocar una gota sobre la placa de vidrio. Agregar una gota del antisuero polivalente O y mezclar con un agujero o ansa limpia y estéril. Inclinar con movimientos una y otra vez durante un minuto. Observar el resultado contra un fondo oscuro y con buena luz. Considerar cualquier grado de aglutinación como positivo.

Antisuero (O) de grupo: utilizar antisueros de grupo, incluyendo el Vi y realizar el mismo procedimiento que para el antisuero polivalente (O)

3.3.5.3. Determinación del antígenos flagelar (H):

A partir del pico de flauta del TSI inocular un caldo BHI e incubar 4h - 6 h a 35°C hasta crecimiento visible (para realizar el test el mismo día) o caldo tripticasa soja-triptona e incubar 24 h \pm 2 h a 35 °C (para realizar el test al día siguiente). Agregar 2.5 ml de solución salina fisiológica formolada a 5 ml de cualquiera de los caldos arriba mencionados.

Colocar 0.5 ml de una dilución apropiada del antisuero polivalente flagelar (H) en un tubo para serología y agregar 0.5 ml del antígeno.

Realizar un control de autoaglutinación mezclando 0.5 ml de solución salina fisiológica formolada con 0.5 ml del antígeno. Incubar la mezcla en baño de agua 48°C - 50°C. Observar a intervalos de 15 minutos y leer el resultado final en 1 h.

Tratamiento de cultivos que dan antígeno flagelar negativo:

En el caso de cepas con antígeno flagelar negativo pero que presentan un perfil bioquímico de *Salmonella* puede tratarse de cepas no móviles o que el antígeno flagelar está poco desarrollado. En este caso proceder de la siguiente manera:

Inocular una pequeña cantidad de crecimiento a partir del pico de flauta del TSI en una placa de Petri con agar semisólido. Inocular por punción a 10 mm de los bordes de la placa y a 2 - 3 mm de profundidad (no tocar el fondo de la placa). Incubar 24 h a 35°C. Si el microorganismo presenta una movilidad de 40 mm o más, realizar el ensayo de la siguiente manera:

Transferir una ansada de crecimiento tomada de los bordes del crecimiento (zona de mayor movilidad) a caldo tripticasa soja-triptona, repetir la prueba de

aglutinación con el antisuero polivalente flagelar (H) como en 3.3.5.3. Si el cultivo no presenta movilidad después de 24 h de incubación a 35°C, incubar hasta 5 días a 25°C. Si después de 5 días de incubación no muestra movilidad clasificar el cultivo como no móvil.

3.3.6. Interpretación de las pruebas bioquímicas y serológicas

Reacciones bioquímicas y serológicas de *Salmonella*.

Prueba	Resultado		Resultado para <i>Salmonella</i> spp (a)
	positivo	negativo	
Glucosa (TSI)	fondo amarillo	fondo rojo	(+)
Lisina decarboxilasa (LIA)	fondo violeta	fondo amarillo	(+)
H₂S (TSI y LIA)	ennegrecimiento	sin ennegrecimiento	(+)
Ureasa	rojo- violeta	sin cambio de color	(-)
Caldo lisina decarboxilasa	violeta	amarillo	(+)
Caldo dulcitol rojo fenol	amarillo y/o gas	sin gas y sin cambio de color	(+) ^(b)
Caldo KCN	crecimiento	sin crecimiento	(-)
Caldo malonato	azul	sin cambio de color	(-) ^(c)
Indol	color rojo fuerte en la superficie	color amarillo en la superficie	(-)
Antisuero polivalente flagelar	aglutinación	sin aglutinación	(+)
Antisuero polivalente somático	aglutinación	sin aglutinación	(+)
Caldo lactosa rojo fenol	amarillo y/o gas	sin gas y sin cambio de color	(-) ^(c)
Caldo sucrosa rojo fenol	amarillo y/o gas	sin gas y sin cambio de color	(-)
Voges Proskauer	rosa a rojo	sin cambio de color	(-)
Rojo de metilo	rojo	amarillo	(+)
Citrato de Simmons	crecimiento, azul	sin crecimiento, sin cambio de color	V

(a) (+): 90% o más positivo en 1 o 2 días, (-): 90% o más negativo en 1 o 2 días, V: variable

(b) La mayoría de las *S. arizonae* son negativas

(c) La mayoría de las *S. arizonae* son positivas

Criterio para descartar cultivos *Salmonella* negativos

Prueba	Resultado
Ureasa	(+)
Indol y antisuero polivalente flagelar (H)	(+) (-)
Lisina decarboxilasa y caldo KCN	(-) (+)
Caldo lactosa rojo fenol	(+) ^{(a), (b)}
Caldo sucrosa rojo fenol	(+) ^(b)
Caldo KCN, Voges-Proskauer y Rojo de metilo	(+) (+) (-)

(a) Realizar pruebas adicionales a los caldos malonato positivo para determinar si se trata de *Salmonella arizonae*

(b) No descartar cultivos positivos si presentan un LIA típico de *Salmonella*, realizar pruebas adicionales para determinar si se trata de *Salmonella* spp.

3.3.7. Tipificación

Una vez identificado el microorganismo como *Salmonella* spp. por propiedades bioquímicas y serológicas, las cepas aisladas deben ser enviadas al Centro de Referencia Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbrán”, para una mayor tipificación.

3.3.8. Expresión de los resultados

De acuerdo a los resultados de la interpretación (3.3.6) indicar presencia o ausencia de *Salmonella* spp. en la cantidad de muestra analizada (por gramos o mililitros para muestras líquidas).

4. ANEXOS

ANEXO 1: Medios de cultivos y reactivos

1. Caldo lactosa

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	5.0 g
Lactosa	5.0 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua, si es necesario calentar. Ajustar el pH a 6.9 ± 0.2 a 25°C. Distribuir en frascos o tubos de acuerdo a las necesidades analíticas. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

2. Leche descremada en polvo (reconstitución)

Leche en polvo descremada	100 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua. Distribuir en frascos o tubos de acuerdo a las necesidades analíticas. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

3. Caldo selenito cistina (SC)

Medio 1 (modificación de Leifson)

Triptona o polipeptona	5.0 g
Lactosa	4.0 g
Selenito sódico (NaHSeO_3)	4.0 g
Sodio dihidrógeno fosfato (NaHPO_4)	10.0g
L - cistina	0.01g
Agua destilada	1000 ml

Calentar agitando hasta disolver. Ajustar el pH a 7.0 ± 0.2 a 25°C. Distribuir 10 ml en tubos estériles. NO AUTOCLAVAR.

Medio 2 (modificación de North-Bartram)

Polipeptona	5.0 g
Lactosa	4.0 g
Selenito sódico (NaHSeO_3)	4.0 g
Sodio dihidrógeno fosfato (NaH_2PO_4)	5.5 g
Dipotasio hidrógeno fosfato (K_2HPO_4)	4.5 g
L - cistina	0.01 g
Agua destilada	1000 ml

Calentar agitando hasta disolver. Ajustar el pH a 7.0 ± 0.2 a 25°C. Distribuir 10 ml en tubos estériles. NO AUTOCLAVAR. Usar el mismo día de la preparación.

4. Medio tetracionato (TT)

4.1. Medio tetracionato base

Polipeptona	5.0 g
Sales biliares	1.0 g
Carbonato de calcio	10.0 g
Tiosulfato de sodio pentahidratado ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	30.0 g
Agua destilada	1000 ml

Calentar agitando hasta disolver. NO AUTOCLAVAR (el precipitado no se disolverá completamente). Enfriar lentamente hasta los 45°C. Mantener entre 5°C - 8°C. Ajustar el pH final a 8.4 ± 0.2 .

4.2. Solución yodo-ioduro de potasio ($\text{I}_2\text{-KI}$)

Ioduro de potasio	5.0 g
Yodo resublimado	6.0 g
Agua destilada	20 ml

Disolver completamente el ioduro de potasio en 5 ml de agua, luego agregar el yodo y llevar a 20 ml con agua destilada estéril.

4.3. Solución verde brillante

Colorante verde brillante estéril	0.1 g
Agua destilada	100 ml

4.4. Medio tetracionato completo

El día de uso agregar 20 ml de la solución $\text{I}_2\text{-KI}$ y 10 ml de la solución de verde brillante a 1 litro de medio base. Resuspender el precipitado agitando la solución y colocar asépticamente 10 ml en tubos estériles. No calentar la solución luego del agregado del $\text{I}_2\text{-KI}$ y del colorante.

5. Medio Rappaport-Vassiliadis (RV)

5.1. Caldo base

Triptona	5.0 g
Cloruro de Sodio	8.0 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH_2PO_4)	1.6 g
Agua destilada	1000 ml

5.2. Solución de cloruro de magnesio

Cloruro de Magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	400 g
Agua destilada	1000 ml

5.3. Solución de oxalato de verde de malaquita

Oxalato de verde de malaquita	0.4 g
Agua destilada	100 ml

Para preparar el medio completo, combinar 1000 ml de la solución de caldo base, 100 ml de la solución de cloruro de magnesio y 10 ml de la solución de

oxalato de verde de malaquita (llegando a un volumen final del medio completo de 1110 ml). Debe ser preparada en el mismo día de uso. Dispensar 10 ml del medio completo en tubos y autoclavar a 115°C durante 15 minutos, pH 5.5 final \pm 0.2. Guardar en refrigeración y usar hasta dentro de 1 mes del día de su preparación.

Este medio debe ser preparado usando los componentes por separado. No se recomienda el uso de fórmulas completas deshidratadas.

NOTA: La solución de cloruro de magnesio puede ser guardada en un frasco de color caramelo al abrigo de la luz por un año. Para preparar la solución utilizar $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ de un envase nuevo, ya que esta sal es muy higroscópica.

La solución de verde de malaquita puede ser guardada en una botella oscura por el lapso de 6 meses. Para la preparación de la solución 5.3 se recomienda el uso de oxalato de verde de malaquita de Merck porque con otras marcas no se obtuvieron resultados efectivos.

6. Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)

Extracto de levadura	3.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Xilosa	3.75 g
Lactosa	7.5 g
Sucrosa	7.5 g
L-Lisina clorhidrato	5.0 g
Tiosulfato de sodio	6.8 g
Citrato férrico amónico	0.8 g
Rojo Fenol	0.08 g
Desoxicolato de sodio	1.0 g
Agar	9 g a 18 g*
Agua destilada	1000 ml

*dependiendo de la fuerza gel del agar

Disolver los componentes en agua destilada por calentamiento con frecuente agitación hasta ebullición. Evitar sobrecalentamiento.

Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor de 7.4 ± 0.2 a 25°C.

Preparación de las placas: enfriar en baño de agua a 44°C - 47°C, agitar y volcar en placas de Petri. Dejar solidificar.

Inmediatamente antes de usar secar cuidadosamente las placas (sin tapa y con la superficie del agar hacia abajo) en estufa entre 37°C y 55°C hasta que la superficie del agar quede seca.

Almacenar hasta 30 días a $4^\circ C \pm 2^\circ C$.

7. Agar Hektoen Entérico (HE)

Peptona	12.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Sales biliares N ^o 3	9.0 g
Lactosa	12.0 g
Sucrosa	12.0 g
Salicina	2.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Tiosulfato de sodio	5.0 g
Citrato férrico amónico	1.5 g
Azul de bromotimol	0.065 g
Fucsina acida	0.1 g
Agar	14.0 g
Agua destilada	1000 ml

Calentar agitando con frecuencia hasta disolver. No calentar más de un minuto. No sobrecalentar. Enfriar antes de pasar a placa. Secar 2 h con las tapas abiertas. Ajustar el pH final a 7.5 ± 0.2 . Almacenar hasta 30 días a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

8. Agar sulfito de bismuto (Wilson and Blair)

Polipeptona (o peptona)	10.0 g
Extracto de carne	5.0 g
Dextrosa	5.0 g
Disodio hidrógeno fosfato anhidro (NaH_2PO_4)	4.0 g
Sulfato de hierro (II) anhidro	0.3 g
Sulfito de Bismuto (indicador)	8.0 g
Verde brillante	0.025 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

Mezclar completamente y calentar con agitación. Calentar durante un minuto hasta obtener una suspensión uniforme (el precipitado no se disuelve). Enfriar a 45°C - 50°C . Resuspender el precipitado con suave agitación y volcar en placas de Petri. Secar 2 h con las tapas abiertas. Ajustar el pH final a 7.7 ± 0.2 . NO AUTOCLAVAR. Preparar las placas un día antes de su uso y guardarlas en la oscuridad. Tener en cuenta que su selectividad disminuye a las 48 h.

9. Medio TSI (triple sugar iron)

MEDIO 1		MEDIO 2	
Polipeptona	20 g	Extracto de carne	3.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g	Extracto de levadura	3.0 g
Lactosa	10.0 g	Peptona	15.0 g
Sacarosa	10.0 g	Proteosa peptona	5.0 g
Glucosa	1.0 g	Lactosa	10.0 g
Citrato de hierro (III)	0.2 g	Sacarosa	10.0 g
Tiosulfato de sodio	0.2 g	Glucosa	1.0 g
Rojo de fenol	0.025 g	Sulfato de hierro (II)	0.2 g
Agar	13 g	Cloruro de sodio	5.0 g
Agua destilada	1000 ml	Tiosulfato de sodio	0.03 g
		Rojo de fenol	0.024 g
		Agar	12.0 g
		Agua destilada	1000 ml

Suspender los componentes del **medio 1** en agua destilada y calentar agitando suavemente. Continuar hasta la disolución de sus ingredientes.

Llenar 1/3 de los tubos de ensayo y tapar manteniendo un medio aeróbico. Autoclavar el **medio 1** a 118 °C durante 15 minutos.

Preparar el **medio 2** de la misma manera que el **medio 1**, teniendo en cuenta la diferencia en el autoclavado a 121°C durante 15 minutos. Antes de solidificar inclinar los tubos para obtener un pico de flauta de 4-5 cm y un fondo de 2-3 mm. Ajustar el pH final a 7.3 ± 0.2 para el **medio 1** y a 7.4 ± 0.2 para el **medio 2**.

10. Caldo triptona (triptofano) al 1 %

Triptona o tripticasa	10.0 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver y fraccionar 5 ml del medio en tubos. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Ajustar el pH final a 6.9 ± 0.2 .

11. Caldo tripticasa soja

Tripticasa	17.0 g
Peptona	3.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Dipotasio hidrógeno fosfato (K_2HPO_4)	2.5 g
Glucosa	2.5 g
Agua destilada	1000 ml

Calentar con suave agitación hasta disolver. Fraccionar 225 ml en frascos de Erlenmeyer. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Ajustar el pH final a 7.3 ± 0.2 .

Para el caldo tripticasa soja sin glucosa, preparar el mismo medio sin los 2.5 g de glucosa.

12. Caldo tripticasa soja con sulfato ferroso

Tripticasa	17.0 g
Peptona	3.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Dipotasio hidrógeno fosfato (K ₂ HPO ₄)	2.5 g
Glucosa	2.5 g
Sulfato ferroso	35 mg
Agua destilada	1000 ml

Calentar con suave agitación hasta disolver. Fraccionar 225 ml en frascos de Erlenmeyer. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Ajustar el pH final a 7.3 ± 0.2.

13. Caldo tripticasa soja-triptona

Medio Tripticasa soja (medio comercial deshidratado)	17.0 g
Caldo Triptosa (medio comercial deshidratado)	13.5 g
Extracto de levadura	3.0 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver en 1 litro de agua destilada. Calentar suavemente hasta disolver. Fraccionar 5 ml en tubos de ensayo. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Ajustar el pH final a 7.2 ± 0.2.

14. Caldo MR-VP

Medio 1

Peptona bufferada	7.0 g
Glucosa	5.0 g
Dipotasio hidrógeno fosfato (K ₂ HPO ₄)	5.0 g
Agua destilada	1000 ml

Medio 2

Digesto pancreático de caseína	3.5 g
Digesto péptico de tejido animal	3.5 g
Dextrosa	5.0 g
Fosfato de potasio	5.0 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua, calentando si es necesario. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor de 6.9 ± 0.2 a 25°C después de la

esterilización. Fraccionar 10 ml del medio en tubos. Esterilizar a 118-121°C durante 15 minutos.

Medio 3

Peptona	5.0 g
Glucosa	5.0 g
Fosfato bufferado	5.0 g
Agua destilada	100 ml

Disolver los componentes en agua. Fraccionar 10 ml en tubos de ensayo y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Ajustar el pH final a 7.5 ± 0.2 .

Para *Salmonella*: fraccionar 10 ml en tubos de ensayo y esterilizar a 121°C durante 12-15 minutos.

15. Agar citrato de Simmons

Citrato de sodio	2.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Dipotasio hidrógeno fosfato (K_2HPO_4)	1.0 g
Fosfato de amonio ($NH_4H_2PO_4$)	1.0 g
Sulfato de magnesio ($MgSO_4$)	0.2 g
Azul de bromotimol	0.08 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Calentar con suave agitación hasta disolver. Fraccionar 10 ml en tubos de ensayo cubriendo 1/3 y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Antes de solidificar inclinar los tubos para obtener un pico de flauta de 4 - 5 cm y un fondo de 2 - 3 mm. Ajustar el pH final a 6.8 ± 0.2 .

16. Caldo urea

Urea	20.0 g
Extracto de levadura	0.1 g
Disodio hidrógeno fosfato (Na_2HPO_4)	9.5 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH_2PO_4)	9.1 g
Rojo fenol	0.01 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada. NO CALENTAR. Esterilizar por filtración con membrana de 0.45 μm . Fraccionar 1.5 - 3.0 ml en tubos estériles. Ajustar el pH final a 6.8 ± 0.2 .

17. Caldo urea (rápida)

Urea	20.0 g
Extracto de levadura	0.1 g
Disodio hidrógeno fosfato (Na_2HPO_4)	0.95 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH_2PO_4)	0.91 g
Rojo fenol	0.01 g
Agua destilada	1000 ml

Preparar como el medio anterior 16 (Caldo Urea)

18. Caldo malonato

Extracto de levadura	1.0 g
Sulfato de amonio (NH_4) ₂ SO ₄	2.0 g
Dipotasio hidrógeno fosfato (K_2HPO_4)	0.6 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH_2PO_4)	0.4 g
Cloruro de sodio	2.0 g
Malonato de sodio	3.0 g
Glucosa	0.25 g
Azul de bromotimol	0.025 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver calentando, si es necesario. Fraccionar 3 ml en tubos de ensayo y esterilizar 121°C durante 15 minutos. Ajustar el p H final a 6.7 ± 0.2 .

19. Lisina hierro agar (LIA) (Edwards y Fife)

Peptona	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	1.0 g
L-Lisina clorhidrato	10.0 g
Citrato amoniacal férrico	0.5 g
Tiosulfato de sodio (anhidro)	0.04 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes calentando. Fraccionar 4 ml del medio en tubos de 13 mm x 100 mm. Esterilizar a 121°C durante 12 minutos. Antes de solidificar inclinar los tubos para obtener un pico de flauta de 4 - 5 cm y un fondo de 2 - 3 mm. Ajustar el pH final a 6.7 ± 0.2 .

20. Caldo lisina decarboxilasa (Falkow) (para *Salmonella*)

Peptona	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	1.0 g
L-lisina	5.0 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes calentando. Fraccionar 5 ml del medio en tubos de 16 mm x 125 mm. Esterilizar con la tapa a medio abrir a 121°C durante 12 minutos. Cerrar bien la tapa para su almacenamiento y posterior inoculación. Ajustar el pH final a 6.8 ± 0.2.

21. Medio para test movilidad (agar semisólido)

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	10.0 g
Agar	4.0 g
Agua destilada	1000 ml

Calentar con suave agitación hasta que se disuelva el agar. Fraccionar 20 ml en tubos de ensayo de 20 x 150 mm. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Luego enfriar a 45°C y almacenar en refrigeración. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor de 7.4 ± 0.2 después de la esterilización. Al momento de usar, fundir el medio y luego enfriarlo a 45°C. Volcar asépticamente el contenido en placas de Petri estériles. Cerrar y dejar solidificar. Deben ser usadas el mismo día que fueron preparadas.

22. Caldo cianuro de potasio

Cianuro de potasio (KCN) solución 0.5 %	15.0 ml
Polipeptona	3.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH ₂ PO ₄)	0.225 g
Disodio hidrógeno fosfato (Na ₂ HPO ₄)	5.64 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver todos los componentes excepto el cianuro de potasio y esterilizar 121°C durante 15 minutos. Enfriar y guardar en refrigeración a 5 - 8°C. Ajustar el pH final a 7.6 ± 0.2.

Para preparar la solución de cianuro de potasio, agregar 0.5 g de KCN en 100 ml de agua destilada estéril fría a 5 - 8°C. USANDO PIPETA, adicionar 15 ml de la solución de KCN a 1 litro del caldo base.

NO PIPETAR CON LA BOCA Y USAR GUANTES!

Mezclar y fraccionar asépticamente 1.0 - 1.5 ml en tubos estériles. Cerrar los tubos con tapón de parafina. Almacenar los mismos en refrigeración a 5 - 8°C no más de 2 semanas.

23. Caldo rojo de fenol para carbohidratos

Tripticasa o proteosa peptona N°3	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Extracto de carne (opcional)	1.0 g
Rojo de fenol (7.2 ml de una solución de rojo de fenol al 0.25%)	0.018 g
Agua destilada	1000 ml
Carbohidrato *	

*Disolver 5 g de dulcitol, 10 g de lactosa o 10 g de sacarosa (según se especifique en el test de *Salmonella*) en el medio de base. Fraccionar 2.5 ml en tubos que contengan campanita para fermentación. Esterilizar a 118°C durante 15 minutos y enfriar. Alternativamente disolver los ingredientes (omitiendo los carbohidratos) en 800 ml de agua destilada calentando y agitando suavemente. Dispensar 2.0 ml en tubos de 13 x 100 mm conteniendo 1 campanita de fermentación invertida (campana de Durhan). Autoclavar a 118°C durante 15 minutos y dejar enfriar. Disolver cada carbohidrato en 200 ml de agua destilada y esterilizar por filtración. Adicionar 0.5 ml de la solución filtrada en cada tubo con caldo base, después de enfriarlo a 45°C. Agitar suavemente para mezclar. Ajustar el pH final a 7.4 ± 0.2 .

24. Caldo púrpura de bromo cresol para carbohidratos

Proteosa peptona N°3	10.0 g
Extracto de carne	1.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agua destilada	1000 ml

Preparar el caldo según las instrucciones del medio rojo de fenol. Ajustar el pH final a 6.8 ± 0.2 .

25. Agar Mac Conkey

Proteosa peptona o polipeptona	3.0 g
Peptona	17.0 g
Lactosa	10.0 g
Sales biliares	1.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Rojo neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.001 g
Agar	13.5 g
Agua destilada	1000 ml
pH final a 25°C 7.1 ± 0.2	

Suspender los componentes y calentar con suave agitación hasta disolver. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar entre 45 - 50°C y fraccionar 20 ml en placas de Petri estériles.

26. Caldo nutritivo

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	5.0 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor después de la esterilización de 6.8 ± 0.2 a 25°C. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

27. Caldo BHI

Medio 1

Infusión de cerebro	200 g
Infusión de corazón	250 g
Proteasa peptona o polipeptona	10.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Dextrosa	2.0 g
Disodio hidrógeno fosfato (Na ₂ HPO ₄)	2.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada con suave calentamiento. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor de 7.4 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Fraccionar en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Medio 2

Infusión de corazón cerebro	6.0 g
Digestivo péptico de tejido animal	6.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Dextrosa	3.0 g
Digestivo pancreático de gelatina	14.5 g
Disodio hidrógeno fosfato (Na ₂ HPO ₄)	2.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada, calentar llevando a ebullición durante 1 minuto hasta completa disolución. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor de 7.4 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Fraccionar en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

NOTA: se aceptan caldos BHI disponibles en el comercio.

28. Agar base triptosa sangre

Triptosa	10.0 g
Extracto de carne	3.0 g
NaCl	5.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua, calentar agitando suavemente hasta llevar a ebullición durante 1 minuto. Llenar 1/3 de tubos de ensayo de 16 x 150 mm, tapar y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Antes de solidificar inclinar los tubos para obtener un pico de flauta de 4 - 5 cm y un fondo de 2 - 3 mm.

29. Caldo de preenriquecimiento Universal

Triptona	5.0 g
Proteasa Peptona	5.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Disodio hidrógeno fosfato (Na ₂ HPO ₄)	7.0 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH ₂ PO ₄)	15.0 g
Dextrosa	0.5 g
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	0.25 g
Citrato Férrico amoniacal	0.1 g
Piruvato de sodio	0.2 g
Agua destilada	1000 ml

Calentar con suave agitación hasta disolver los componentes, esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Ajustar el pH final a 6.3 ± 0.2 a 25°C.

30. Caldo de preenriquecimiento Universal sin citrato férrico amoniacal

Triptona	5.0 g
Proteasa Peptona	5.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Disodio hidrógeno fosfato (Na ₂ HPO ₄)	7.0 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH ₂ PO ₄)	15.0 g
Dextrosa	0.5 g
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	0.25 g
Piruvato de sodio	0.2 g
Agua destilada	1000 ml

Calentar con suave agitación hasta disolver los componentes, esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Ajustar el pH final a 6.3 ± 0.2 a 25°C.

31. Agua peptona bufferada (BPW)

Peptona	10.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Disodio hidrógeno fosfato (Na ₂ HPO ₄)	3.5 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH ₂ PO ₄)	1.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua, si es necesario calentar. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Ajustar el pH final a 7.2 ± 0.2 a 25°C.

32. Solución de verde brillante al 1%

Colorante verde brillante	1.0 g
Agua destilada estéril	100 ml

Disolver 1 g del colorante en agua destilada estéril. Diluir a 100 ml, antes del uso realizar prueba de toxicidad con controles conocidos de microorganismos positivos y negativos

33. Solución de púrpura de bromo cresol al 0.2 %

Colorante púrpura de bromo cresol	0.2 g
Agua destilada estéril	100 ml

Disolver 0.2 g del colorante en agua destilada estéril. Diluir a 100 ml

34. Indicador rojo de metilo

Colorante rojo de metilo	0.10 g
Etanol 95%	300 ml
Agua destilada estéril (cantidad necesaria para llevar a 500ml)	

Disolver 0.10 g del colorante en 300 ml de etanol y llevar con agua destilada estéril a volumen final de 500 ml

35. Tergitol aniónico 7

Este reactivo es un sulfato de soldio derivado del 3,9-dietil tridecanol-6. Es un agente emulsificador aniónico.

36. Tritón X-100

Es un agente surfactante no iónico. Este reactivo es una marca registrada para el octil fenol etoxilado. Se utiliza como agente emulsificador.

37. Solución salina 0.85%

Cloruro de sodio (NaCl)	8.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver el NaCl en agua destilada, esterilizar a 121°C, durante 15 minutos.

38. Solución salina fisiológica formolada

Solución de formaldehído (63-38%)	6.0 ml
Cloruro de sodio (NaCl)	8.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver el NaCl en agua destilada, esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a temperatura ambiente, agregar 6 ml de la solución de formaldehído. No autoclavar después de agregar el formaldehído.

39. Reactivos para la reacción de Voges-Proskauer (VP)

Solución 1: Solución alcohólica de α -naftol

α -Naftol	5.0 g
Etanol 96%	100 ml

Disolver el α -Naftol en alcohol.

Solución 2: Solución de hidróxido de potasio

Hidróxido de potasio	40.0 g
Agua destilada	100 ml

Disolver el hidróxido de potasio en agua.

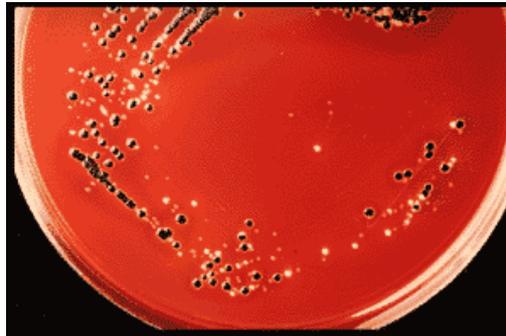
40. Reactivo de Kovacs (para reacción de indol)

Alcohol amílico o isoamílico	75.0 ml
p-dimetilamino-benzaldehído	5.0 g
Acido clorhídrico concentrado (HCl)	25.0 ml

Disolver el aldehído en el alcohol. Agregar lentamente el ácido a la mezcla aldehído-alcohol. Proteger de la luz en un frasco de vidrio de color marrón y guardar en refrigeración a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. El reactivo debe mantener un color amarillo a marrón claro, libre de precipitado.

ANEXO 2: FOTOS

1. Agar Xilosa Lisina Desoxicolato



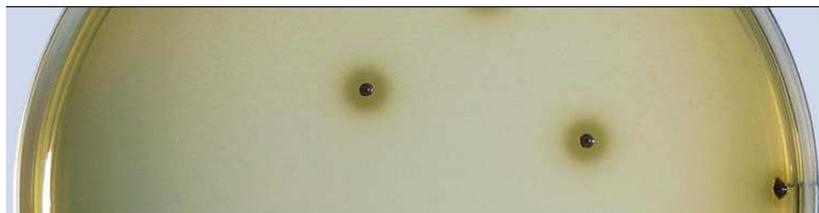
Salmonella spp: colonias típicas transparentes, del mismo color del medio con centro negro.

2. Agar Xilosa Lisina Desoxicolato



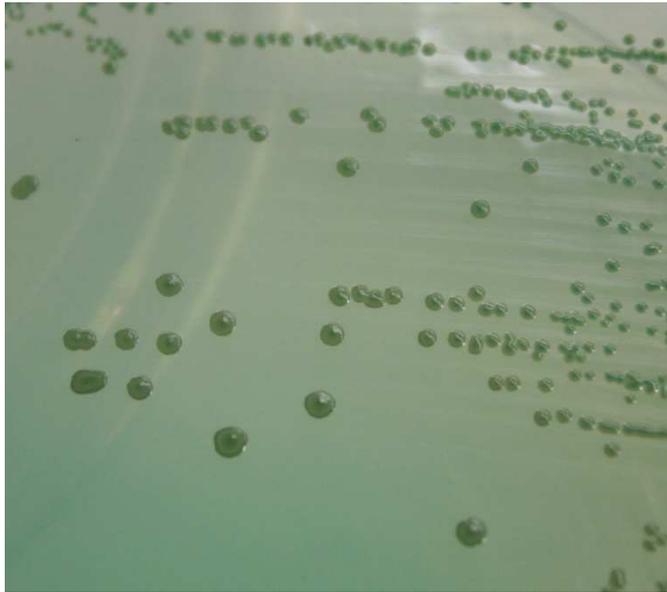
Salmonella Choleraesuis: colonias típicas transparentes, del mismo color del medio sulfhídrico negativo.

3. Agar Bismuto Sulfito



Salmonella Thypi: colonias negras con brillo metálico, rodeadas por un halo negro.

4. Agar Bismuto Sulfito



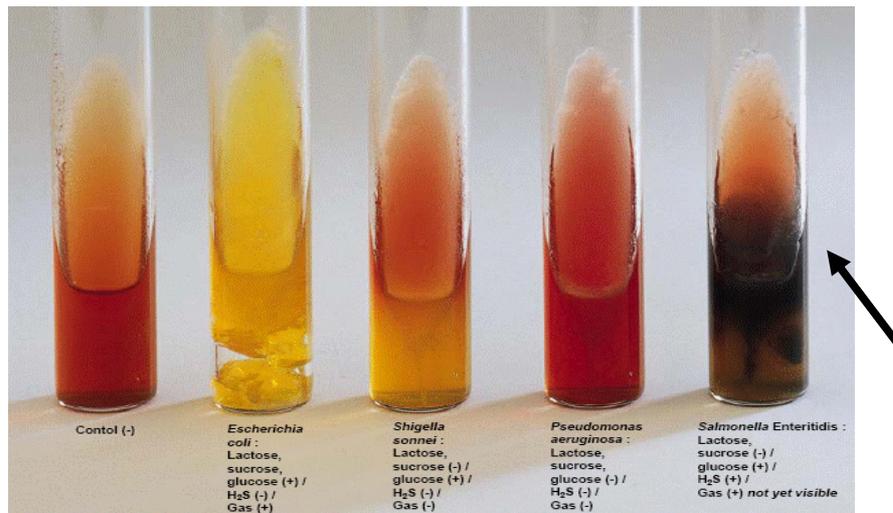
Salmonella Choleraesuis: colonias verdosas.

5. Agar Hektoen Entérico



Salmonella Thypimurium: colonias verde oscuro con centro negro

6. Agar TSI



Salmonella Enteritidis: TSI

5. REFERENCIAS:

Bacteriological Analytical Manual. Chaper 5, *Salmonella*. December 2007 Edition. FDA U.S. Food and Drug Administration

***Escherichia coli* O157:H7/NM en alimentos**

1. Generalidades

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC), incluido el serotipo O157:H7, es un patógeno emergente asociado a casos de diarrea, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico (SUH) y trastornos de coagulación (púrpura trombocitopénica trombótica) en seres humanos.

Escherichia coli enterohemorrágica (ECEH) se identificó por primera vez como patógeno humano en 1982, cuando se detectaron en dos brotes de colitis hemorrágica en los Estados Unidos cepas de un serotipo antes poco frecuente, el O157:H7. A partir de entonces se han registrado y se siguen registrando brotes de infección por ECEH O157:H7 en muchas regiones del mundo. [1]

El período de incubación promedio de la infección por STEC es de 3 días (con un rango de 1 - 8 días) y el cuadro clínico incluye un período de 1 a 2 días de vómitos, fiebre baja o ausente, dolores abdominales severos y diarrea sin sangre, como síntomas iniciales, seguidos por diarrea sanguinolenta o colitis hemorrágica durante 4 a 6 días. Aunque en la mayoría de los casos la diarrea por STEC es autolimitada, aproximadamente el 5 a 10% de los niños infectados evolucionan a SUH. [2]

La complicación de la enfermedad afecta particularmente a niños, ancianos y aquellos que, por padecer otras enfermedades, tengan su sistema inmunológico deprimido.

2. Reservorio y fuente de infección

Los rumiantes en general y el ganado vacuno en particular, han sido señalados como los principales reservorios de STEC.

La contaminación de la canal durante el sacrificio es la ruta primaria que últimamente lleva a la contaminación de la carne picada de vacuno. El escenario más normal que conduce a que se presente la enfermedad es una cocción insuficiente, la supervivencia del patógeno y la subsecuente infección. [3]

La principal vía de transmisión son los alimentos contaminados como carne molida, productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, embutidos fermentados, leche y jugos no pasteurizados, vegetales que se consumen crudos, etc.

Otras formas de transmisión incluyen la contaminación cruzada durante la preparación de alimentos, el contacto directo del hombre con los animales, bañarse en aguas recreacionales contaminadas y de persona a persona por la ruta fecal-oral.

3. Factores de virulencia

Las cepas STEC de origen humano, animal o de alimentos pueden producir dos tipos de toxinas Shiga, Stx1 y Stx2, que poseen efectos citotóxicos en células Vero y portan marcadores de virulencia accesorios como el gen *eae* y el gen *hlyA*. El gen *eae* codifica una proteína, denominada intimina, la cual induce una unión íntima de la bacteria al enterocito y la desorganización de las microvellosidades, con producción de la lesión AE (“attaching and effacing”); y el gen *hlyA* codifica una enterohemolisina. [1]

E. coli O157 posee la mayoría de las características bioquímicas de la especie, con las siguientes diferencias:

- ✓ No fermenta el sorbitol o lo hace lentamente
- ✓ No posee actividad de β - glucuronidasa
- ✓ Temperatura óptima de crecimiento: 30°C - 42°C
- ✓ Desarrolla pobremente a 44°C - 45°C
- ✓ No desarrolla a temperaturas superiores a 45°C
- ✓ No desarrolla a temperaturas de -10°C, pero sobrevive en productos congelados (-20°C), sin cambio en el número total de microorganismos por períodos prolongados
- ✓ Es resistente a los cambios de pH

4. Incidencia

La notificación de las infecciones por *E. coli* O157:H7 experimentaron un aumento exponencial a partir de su primera aparición en 1982.

Los numerosos brotes y casos esporádicos detectados en distintas partes del mundo, así como también la cantidad de vehículos de transmisión identificados llevaron a promover estrategias de prevención y control.

En Canadá, la incidencia de las infecciones por *E. coli* O157:H7 es de 5,3/100.000 habitantes.

En Asia hay pocos reportes de infecciones por STEC, salvo en Japón donde hubo un brote masivo con más de 10.000 afectados en el año 1996.

En EE.UU. *E. coli* productor de toxina Shiga es el causante de diarrea en 72.000 habitantes por año, de los cuales el 5%, evolucionan a SUH. En dicho país, en el año 2002 el número de casos fue de 1,7/100.000 habitantes, registrándose que más del 50% de los brotes de origen alimentario fue debido a carne picada. [4]

En Argentina el SUH es endémico; es el país con mayor incidencia de SUH a nivel mundial (13,9/100000 niños menores de 5 años).

La enfermedad está distribuida en todo el país, pero la frecuencia es mayor en las provincias del centro y sur.

En el año 2006, en Argentina hubo 464 casos notificados, de los cuales el 60 % eran menores de 2 años. La letalidad en la fase aguda fue del 3,2 %.

En niños, es la primera causa de insuficiencia renal aguda, y la segunda de insuficiencia renal crónica. Causa el 20 % de los trasplantes renales en niños y adolescentes. [1]

Referencias:

1. Evaluación del riesgo de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) en la carne y los productos cárnicos.
http://www.fao.org/ag/agn/agns/jemra_riskassessment_ecoli_es.asp
2. ICMSF Microbiología de los alimentos 7. Editorial ACRIBIA. Capítulo 17.
3. Manual de procedimientos: Detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga O157 y no-O157 en alimentos. Servicio de Fisiopatogenia. Departamento de Bacteriología INEI- ANLIS "Carlos G. Malbrán", 2009.
4. Responsible use of antibiotics in aquaculture.
<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0282e/a0282e00.pdf>

Detección, aislamiento e identificación de *Escherichia coli* O157:H7/NM en productos cárnicos

(Procedimiento según USDA/FSIS: 2010)

1. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar la detección, aislamiento e identificación de *E.coli* O157:H7/NM en productos cárnicos.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica para realizar la detección, aislamiento e identificación de *E.coli* O157:H7 en productos cárnicos.

Una vez identificado y confirmado el microorganismo como *E.coli* O157:H7/NM por propiedades bioquímicas y serología, determinar la producción de toxinas Stx1 y Stx2 o la presencia de los genes que codifican para las mismas.

NOTA: Las cepas aisladas deben ser enviadas al Centro de Referencia Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbrán”, para una mayor caracterización y determinación de los factores de virulencia.

3. DESARROLLO

3.1. Medios de cultivo, materiales, reactivos y equipos

- 3.1.1. Suplemento cefixima telurito bioMérieux (Ref 42606) o equivalente
- 3.1.2. Solución salina bufferada con 0.05% de Tween 20 (PBS-Tween 20)
- 3.1.3. Solución fisiológica (SF)
- 3.1.4. Solución de novobiocina 4mg/ml
- 3.1.5. Partículas inmunomagnéticas anti *E.coli* O157 (ej. Dynabeads anti-*E.coli* O157)
- 3.1.6. Kit de identificación bioquímica. Ejemplo Test Api 20E (bioMérieux), GNI - VITEX o equivalente.
- 3.1.7. Kit para prueba de tamizaje (screening test): Kit de ensayo para detección de *E.coli* O157:H7/NM que cumpla con las siguientes especificaciones:
 - Sensibilidad: $\geq 98\%$
 - Especificidad: $\geq 90\%$
 - Falsos negativos: $\leq 2\%$
 - Falsos positivos: $\leq 10\%$

Ejemplo: Transia Card *E. coli* O157:H7 (Diffchamb), RapidChek Pathogen Screening Test Kit (Strategic Diagnostics) o equivalente, BAX System PCR Assay for Screening *E. coli* O157:H7 MP kit o equivalente.

- 3.1.8. Antisuero anti-O157 (Instituto Malbrán) o kit de látex anti-O157 disponible en el comercio. Ejemplo RIM *E. coli* O157:H7 (REMEL) o equivalente
- 3.1.9. Antisuero anti-H7 (Instituto Malbrán) o kit de látex anti-O157 disponible en el comercio. Ejemplo RIM *E. coli* O157:H7 (REMEL) o equivalente
- 3.1.10. Kit para detección de toxina Shiga disponible en el comercio. Ejemplo Meridian Premier EHEC kit (Meridian Diagnostics) o equivalente
- 3.1.11. Caldo triptona soja modificado con novobiocina (TSBm+n)
- 3.1.12. Agar MacConkey sorbitol con cefixima-telurito (SMAC-CT)
- 3.1.13. Medio Cromogénico: CHROMAgar o equivalente
- 3.1.14. Agar tripticasa de soja (TSA)
- 3.1.15. Triple sugar iron (TSI)
- 3.1.16. Agar citrato de Simmons
- 3.1.17. Medio sulfhídrico, indol, movilidad (SIM)
- 3.1.18. Caldo Voges Proskauer - rojo de metilo.(VP-RM)
- 3.1.19. Caldo sorbitol al 1 % en medio base con indicador
- 3.1.20. Medio urea de Christensen
- 3.1.21. Medio para lisina decarboxilasa
- 3.1.22. Medio para ornitina decarboxilasa
- 3.1.23. Balanza, sensibilidad 0.1g
- 3.1.24. Homogeneizador tipo Stomacher
- 3.1.25. Equipo para concentración inmunomagnética (ej. Dynal MPC-S)
- 3.1.26. Bolsas para Stomacher
- 3.1.27. Estufa de incubación a 35°C ± 1°C
- 3.1.28. Micropipeta de 1000 ul
- 3.1.29. Micropipeta de 20 µl
- 3.1.30. Micropipeta de 50 µl
- 3.1.31. Tips
- 3.1.32. Ansa de inoculación
- 3.1.33. Espátula de Drigalsky
- 3.1.34. Tubos Eppendorf
- 3.1.35. Placas de vidrio para reacción de aglutinación

3.2. Principio

El método está basado en 5 etapas:

- 3.2.1. Enriquecimiento en medio selectivo
- 3.2.2. Tamizaje rápido (Screening test)
- 3.2.3. Concentración Inmunomagnética
- 3.2.4. Aislamiento en medios selectivos y diferenciales
- 3.2.5. Identificación y caracterización de los aislamientos.

3.3. Procedimiento

3.3.1. Enriquecimiento

Pesar 65 g \pm 2 g de la muestra, colocar en una bolsa de Stomacher, agregar 585 ml \pm 11.7 ml de caldo TSBm+n y homogeneizar durante 2 minutos en Stomacher.

Incubar a 42 °C \pm 1°C durante 15 h a 22 h.

Incluir un control positivo, otro negativo y un medio sin inocular como controles para cada grupo de muestras analizadas.

Nota: En el caso de carne de vaca cruda molida, y carne de vaca cruda molida mezclada con pollo o cerdo, pasteles o empanadas rellenos con carne cocidos, y recortes de carne, se pueden combinar 5 muestras de 65 g para obtener una muestra compuesta (pool) de 325 g \pm 32.5 g. Llevar a dilución 1:4 con 975 ml \pm 19.5 ml de caldo TSBm+n y homogeneizar durante 2 minutos en Stomacher.

3.3.2. Prueba de tamizaje (test de Screening)

Del caldo de enriquecimiento realizar el test de screening siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las muestras que dan un resultado negativo en el test de screening se consideran NEGATIVAS para *E.coli* O157:H7/NM.

Las muestras que dan un resultado positivo en el test de screening se consideran PRESUNTIVAMENTE POSITIVAS para *E.coli* O157:H7/NM y se continúa con la concentración inmunomagnética.

3.3.3. Concentración inmunomagnética: Procedimiento para Kit marca Dynabeads anti-*E.coli* O157 y equipo Dynal MPC-S

NOTA: en caso de utilizar otro kit comercial seguir las especificaciones del fabricante.

- 3.3.3.1. Colocar el número de tubos Eppendorf que sean necesarios en el Dynal MPC-S (concentrador magnético de partículas), sin el plato magnético.
- 3.3.3.2. Resuspender Dynabeads anti *E.coli* O157 hasta que desaparezca el pellet. Tomar con la pipeta 20 μ l y colocar en los tubos.
- 3.3.3.3. Agregar con pipeta 1 ml del preenriquecimiento. Cerrar la tapa.
- 3.3.3.4. Agitar en vórtex 15 segundos y luego invertir el Dyna MPC-S unas cuantas veces (aprox. 20 veces). Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos con suave agitación para evitar depósitos.
- 3.3.3.5. Insertar el plato magnético, invertir varias veces, hasta observar un botón en la pared que contacta el imán. Dejar en reposo 3 minutos.
- 3.3.3.6. Abrir los tubos utilizando el abridor, aspirar el sobrenadante con precaución de no desprender las perlas de la pared que contacta con el imán.
- 3.3.3.7. Remover el plato magnético.

- 3.3.3.8. Agregar 1 ml del Buffer PBS-Tween, cerrar la tapa, invertir el Dynal MPC-S unas cuantas veces para resuspender las perlas hasta homogeneizar la solución.
- 3.3.3.9. Repetir los pasos del 3.3.3.5 al 3.3.3.8
- 3.3.3.10. Repetir los pasos del 3.3.3.5 al 3.3.3.7
- 3.3.3.11. Resuspender las partículas en 100 µl de PBS-Tween usando el vórtex

3.3.4. Siembra en medios específicos

- 3.3.4.1. Dispensar 50 µl de las partículas concentradas 3.3.3.11. en una placa de CT-SMAC y sembrar en forma aislada con un ansa o espátula de Drigalsky. Incubar las placas a 35°C ± 1°C durante 18 h a 24 h.
- 3.3.4.2. Dispensar 50 µl de las partículas concentradas 3.3.3.11. en una placa de medio cromogénico para *E. coli* O157 y sembrar en forma aislada con un ansa o espátula de Drigalsky. Incubar las placas a 35°C ± 1°C durante 18 h a 24 h.

NOTA: Dependiendo del tipo de alimento y su flora microbológica la incubación del caldo de enriquecimiento por 20 h a 24 h puede aumentar el crecimiento de otras bacterias en los agares selectivos, dificultando el aislamiento de *E.coli* O157.

La inoculación de los medios selectivos con diluciones de las partículas concentradas, o con la siembra de un volumen menor a 50 µl, puede aumentar la posibilidad de obtener colonias aisladas de *E.coli* O157, aunque esto puede aumentar también el límite de detección de la técnica.

3.3.5. Selección de colonias típicas de *E.coli* O157

Las colonias típicas de *E.coli* O157 en el agar SMAC-CT son incoloras o grises, de 1 a 2 mm de diámetro. Las bacterias que fermentan el sorbitol, como la mayoría de las *E. coli*, producen colonias rosas.

Las características de las colonias típicas de *E. coli* O157 en el agar cromogénico dependen de la marca utilizada (seguir las instrucciones del fabricante).

3.3.6. Prueba de aglutinación con látex anti O157

A partir de los medios específicos de aislamiento (3.3.4) realizar la prueba de aglutinación con el reactivo látex Anti O157 picando una porción de cada una de las colonias sospechosas aisladas.

3.3.7. Aislamiento en agar TSA

Picar todas las colonias típicas que dieron una reacción positiva para la prueba de aglutinación con látex anti O157 (3.3.6) (hasta un total de 5 colonias por cada muestra) y estriar en agar TSA. Incubar a 35°C ± 1°C durante 16 h a 24 h.

3.3.8. Confirmación bioquímica

A partir de las colonias aisladas en TSA (3.3.7), realizar la confirmación bioquímica mediante el kit de identificación bioquímica (ej. Test Api 20E bioMérieux, GNI - VITEX o equivalente) siguiendo las instrucciones del fabricante) o pruebas bioquímicas en tubo.

Pruebas bioquímicas:

Pruebas bioquímicas	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i> O157:H7	<i>E.hermanii</i>
Fermentación de glucosa	+	+	+
Fermentación de lactosa	+	+	+
Fermentación de sacarosa	+	+	+
Formación de ácido sulfhídrico	-	-	-
Producción de gas	+	+	+
Utilización de citrato	-	-	-
Producción de indol	+	+	+
Movilidad	móvil/no móvil	Móvil	móvil
Fermentación de sorbitol	+	-	-
Actividad β -glucuronidasa	+	-	-
Producción de ureasa	-/+	-/+	-
Actividad lisina decarboxilasa	+ (90%)	+ (100%)	- (6%)
Opcionales:			
Actividad ornitina decarboxilasa	+ (95%)	+ (100%)	+ (100%)
Fermentación de celobiosa	- (2%)	- (2%)	+ (97%)
Utilización de malonato	-	-	-

3.3.9. Confirmación serológica

Se pueden utilizar reactivos de látex anti-O157 y anti H7 comerciales o sueros provistos por el Centro de Referencia Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbrán”.

3.3.9.1. Detección del antígeno somático O

3.3.9.1.1. Látex anti-O157: kit de ensayo comercial MicroScreen *E. coli* O157 o equivalente. Seguir instrucciones dadas por el fabricante.

3.3.9.1.2. Antisuero anti-O157

- Colocar separadamente dos gotas de 20 μ l de solución fisiológica (SF) en una placa de vidrio
- Mezclar una ansada del cultivo en TSA con SF
- Observar las dos suspensiones iluminando la placa con luz de una lámpara.

Nota 1: Si la muestra aglutina por sí misma no se debe continuar con el ensayo.

Una muestra autoaglutinada corresponde a una cepa rugosa, la cual puede revertir al estado liso realizando sucesivos pasajes en agar sangre o en agar Mueller Hinton.

- Agregar 15 µl del suero anti-O157 a una de las dos suspensiones y mezclar.
- Mover la placa mediante rotación suave durante un minuto.
- Observar la apariencia de las suspensiones con luz de una lámpara.

Nota 2: La suspensión sin el agregado de antisuero se utiliza como control negativo.

Nota 3: En cada ensayo se deben realizar control de los reactivos utilizando cepas patrones positivas y negativas.

Interpretación de resultados:

Suspensión + antisuero	Aglutinación	Positivo O157
Suspensión + SF	No presenta aglutinación	

Suspensión + antisuero	No presenta aglutinación	Negativo
Suspensión + SF	No presenta aglutinación	

3.3.9.2. Detección del antígeno flagelar H7

- Colocar separadamente dos gotas de 20 µl de solución fisiológica (SF) en una placa de vidrio
- Mezclar una ansada del cultivo en TSA con SF
- Observar las dos suspensiones iluminando la placa con luz de una lámpara.
- Comentario: Si la muestra aglutina por sí misma no se debe continuar con el ensayo.
- Agregar 15 µl del suero anti-H7 a una de las dos suspensiones y mezclar (la suspensión sin el agregado de antisuero se utiliza como control negativo).
- Mover la placa mediante rotación suave durante un minuto.
- Observar la apariencia de las suspensiones con luz de una lámpara.

Nota: En cada ensayo se debe realizar el control de los reactivos utilizando cepas patrones positivas y negativas.

Interpretación de resultados:

Suspensión + antisuero	Aglutinación	Positivo H7
Suspensión + SF	No presenta aglutinación	

Suspensión + antisuero	No presenta aglutinación	Negativo
Suspensión + SF	No presenta aglutinación	

3.3.10. Detección de las toxinas Stx1 y Stx2 y/o de la presencia de los genes que codifican las mismas

Para la detección de las toxinas Stx1 y Stx2 utilizar kits disponibles en el comercio (seguir las especificaciones indicadas por el fabricante), o determinar los genes que codifican las mismas por PCR.

3.4. Interpretación de resultados

3.4.1. Si la cepa aislada es confirmada como *E. coli* O157: H7, se debe informar como: ***E. coli* O157:H7: presencia en 65 g.**

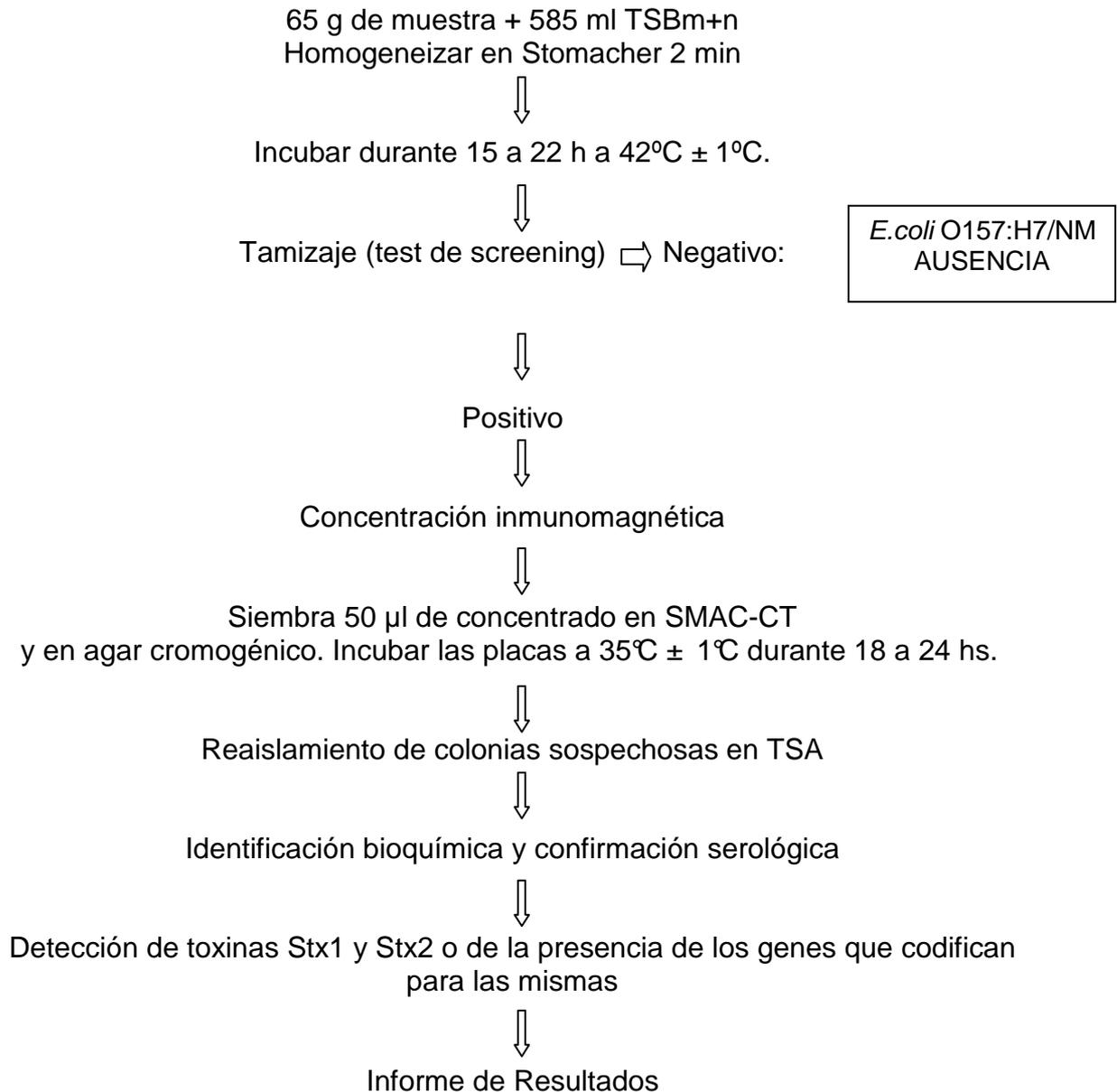
3.4.2. Si la cepa aislada es confirmada como *E. coli* O157: NM, se debe informar como: ***E. coli* O157:NM: presencia en 65 g.**

3.4.3. Si la cepa aislada NO es confirmada como *E. coli* O157: H7 o *E. coli* O157: NM, se debe informar como: ***E. coli* O157:H7/NM: ausencia en 65 g.**

NOTA: Las cepas aisladas deben ser enviadas al Centro de Referencia Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbrán”, para una mayor caracterización y determinación de los factores de virulencia.

4. ANEXOS

ANEXO 1: Diagrama de Flujo del procedimiento para la detección, aislamiento e identificación de *E. coli* O157: H7/NM en productos cárnicos.



ANEXO 2: Medios de cultivos y reactivos

Para la preparación de reactivos y medios de cultivos se siguen las instrucciones dadas por el fabricante.

1. Caldo triptosa soja modificado con novobiocina (TSBm+n)

1.1. Caldo triptosa soja modificado

Caldo Triptona Soja modificado (marca Oxoid CM0989B u otra marca de fórmula equivalente)	33.0 g
Casaminoácidos (hidrolizado ácido de caseína)	10.0 g
Agua destilada	1000 ml
pH final a 25°C 7.4 ± 0.2	

Esterilizar en autoclave a 121°C, durante 20 minutos.

Después de autoclavado y enfriado a aproximadamente 50°C, agregar en esterilidad Novobiocina para obtener una concentración final de 20 µg/ml de medio (5 ml de la solución stock de concentración 4 mg/ml en un litro de medio)

1.2. Solución stock de novobiocina 4mg/ml

Disolver la cantidad necesaria de sodium Novobiocin en agua destilada para llegar a una solución de concentración 4mg/ml (ajustar de acuerdo a la potencia). Esterilizar por filtración y conservar a 4°C durante 30 días en frasco oscuro, al resguardo de la luz.

2. Agar MacConkey sorbitol con cefixima-telurito (SMAC-CT)

Peptona	20.0 g
Sorbitol	10.0 g
Sales biliares	1.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Rojo neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.001 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 ml
pH final a 25°C 7.1 ± 0.2	

Esterilizar en autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Enfriar entre 45°C - 50°C y agregar 4 ml del suplemento cefixima-telurito por 200 ml de medio (concentración final: cefixima: 0.005mg/l, telurito potásico: 2.5 mg/l). Ver reactivos.

3. Medio Cromogénico CHROMAgar O157

Peptona y extracto de levadura	13.0 g
Mezcla cromogénica	12.0 g
Agar	1.5 g
pH: 7.0 ± 0.2	

Añadir al medio deshidratado el volumen correspondiente de agua destilada, mezclar suavemente, calentar a ebullición hasta completa disolución. En caso de utilizar microondas después de un primer hervor, sacar del horno y agitar despacio, volver a poner en el horno por cortos períodos repetidos de calentamiento hasta la fusión completa del agar.

4. Solución salina bufferada con 0.05% de Tween 20 (PBS-Tween 20)

Cloruro de sodio	8.0 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Fosfato ácido disódico anhidro	1.15 g
Fosfato diácido monopotásico	0.2 g
Tween 20	0.5 ml
Agua destilada	1000 ml
pH final a 25°C 7.3 ± 0.2	

Esterilizar en autoclave a 121°C, durante 15 minutos

5. Agar tripticasa de soja (TSA)

Triptona	15.0 g
Oxítone	5.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 ml
pH final a 25°C 7.3 ± 0.2	

Esterilizar en autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

6. Medio para L-Lisina decarboxilasa

L-Lisina monoclóridato (C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ .HCl)	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	1.0 g
Púrpura de bromocresol	0.015 g
Agua	1000 ml

Disolver los componentes en agua, calentando si es necesario. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor de 6.8 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Fraccionar 5 ml del medio en tubos de 18 mm x 160 mm. Esterilizar a 121°C , durante 15 minutos.

7. Medio para L – Ornitina decarboxilasa

L-Ornitina monohidrato ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$)	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	1.0 g
Púrpura de bromocresol	0.015 g
Agua	1000 ml

Disolver los componentes en agua, calentando si es necesario. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor de 6.8 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Fraccionar 5 ml del medio en tubos de 18 mm x 160 mm. Esterilizar a 121°C , durante 15 minutos.

8. Medio para fermentación de hidratos de carbono

8.1. Medio base

Peptona de caseína	10.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Rojo Fenol	0.02 g
Agua	1000 ml

Disolver los componentes en agua agitando si es necesario. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor de 6.8 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Fraccionar el medio en tubos y esterilizar a 121°C , durante 15 minutos.

8.2. Solución de carbohidratos al 10%

(glucosa, lactosa, sacarosa, celobiosa, D-sorbitol)

Carbohidrato	10 g
Agua	100 ml

Para cada solución disolver el respectivo carbohidrato en agua y esterilizar por filtración.

8.3. Medio completo para fermentación de hidratos de carbono

Medio Base (9.1)	900 ml
Solución de carbohidrato (9.2)	100 ml

Para cada carbohidrato agregar asépticamente la respectiva solución en el medio base. Fraccionar 10 ml del medio completo en tubos de 18 mm x 160 mm.

9. Medio citrato de Simmons

Citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	2.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Dipotasio hidrógeno fosfato (K_2HPO_4)	1.0 g
Amonio dihidrógeno fosfato ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)	1.0 g
Sulfato de magnesio (MgSO_4)	0.2 g
Azul de bromotimol	0.08 g
Agar	8.0 g a 18.0 g *
Agua destilada	1000 ml

*dependiendo de la fuerza gel del agar

Disolver los componentes en agua destilada llevando a ebullición. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor de 6.8 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Fraccionar 10 ml del medio en tubos de 18 mm x 160 mm. Esterilizar en autoclave a 121°C , durante 15 minutos. Dejar los tubos tendidos para obtener agar en pico de flauta con un fondo de 2.5 cm de profundidad.

10. Medio TSI (triple sugar iron)

Peptona	20.0 g
Extracto de carne	3.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Lactosa	10.0 g
Sacarosa	10.0 g
Glucosa	1.0 g
Citrato de hierro (III)	0.3 g
Tiosulfato de sodio	0.3 g
Rojo fenol	0.024 g
Agar	8.0 g a 18.0 g *
Agua destilada	1000 ml

*dependiendo de la fuerza gel del agar

Disolver los componentes en agua destilada llevando a ebullición. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor de 7.4 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Fraccionar 10 ml del medio en tubos de 18 mm x 160 mm. Esterilizar en autoclave a 121°C , durante 15 minutos. Dejar los tubos tendidos para obtener agar en pico de flauta con un fondo de 2.5 a 5 cm de profundidad.

11. Medio urea agar (según Christensen)

11.1 Medio base

Peptona	1.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Glucosa	1.0 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH ₂ PO ₄)	2.0 g
Rojo fenol	0.012 g
Agar	9.0 g a 18.0 g *
Agua destilada	1000 ml

*dependiendo de la fuerza gel del agar

Disolver los componentes en agua destilada calentando si es necesario. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor de 6.8 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Esterilizar en autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

11.2. Solución de urea

Urea	400 g
Agua destilada	hasta vol. final de 1000 ml

Disolver la urea en agua. Esterilizar por filtración.

11.3. Medio completo

Solución de urea (11.2)	50 ml
Medio base (11.1)	950 ml

En condiciones asépticas, agregar la solución de urea al medio base previamente fundido y enfriado a 44°C a 47°C. Fraccionar en tubos estériles 10 ml. Dejar solidificar en inclinación para obtener agar en pico de flauta.

12. Medio SIM (sulfhídrico, indol, movilidad)

Tripteína	20.0 g
Peptona	6.1 g
Sulfato de hierro y amonio	0.2 g
Tiosulfato sódico	0.2 g
Agar	3.5 g
Agua destilada	1000 ml

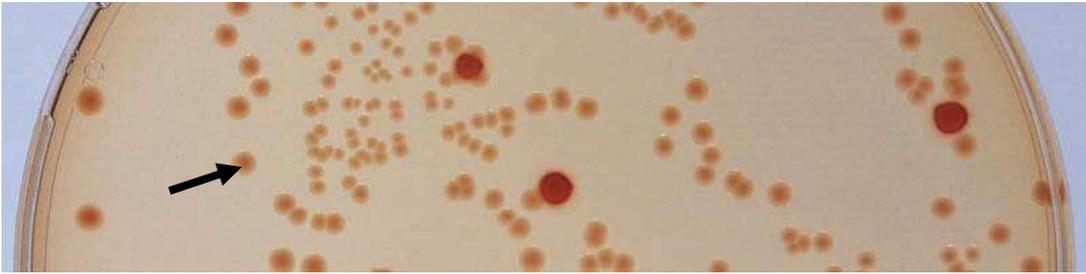
Disolver los componentes en agua destilada llevando a ebullición. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor de 7.3 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Fraccionar 10 ml del medio en tubos de 18 mm x 160 mm. Esterilizar en autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Dejar solidificar en posición vertical.

13. Reactivo para detección de β -Glucuronidasa

Disco impregnado con un glucurónido. Seguir indicaciones del fabricante.

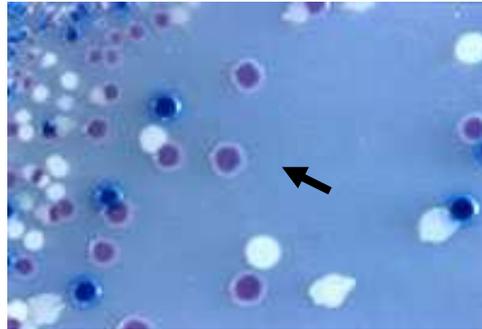
ANEXO 3: Fotos

1. Agar Mac Conkey sorbitol con cefixima telurito (SMAC-CT)



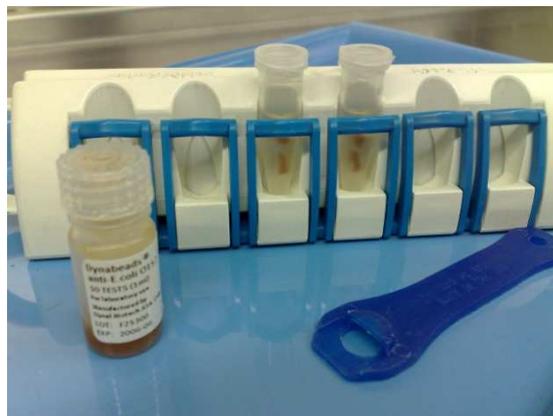
E. coli O157:H7: colonias típicas transparentes a incoloras de 1 mm de diámetro.

2. Agar Medio cromogénico (“Chromagar”)



E. coli O157:H7: colonias típicas de color malva

3. Equipo para concentración inmunomagnética



5. REFERENCIAS

- 5.1. USDA/FSIS. Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7/NM from Meat Products. Revisión MLG 5.05, 10/01/2010.
- 5.2. Manual de Procedimientos para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga O157 en alimentos. WHO Global Salm. Surv. Buenos Aires, Argentina. 15 al 24 de Mayo del 2006.
- 5.3. Mac Faddin. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª Edición.

Detección de *Escherichia coli* O157:H7/NM en alimentos

(Procedimiento según Bacteriological Analytical Manual – FDA: 2011)

1. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar la detección, aislamiento e identificación de *E.coli* O157:H7 en alimentos.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica para realizar la detección, aislamiento e identificación de *E.coli* O157: H7 en alimentos.

Una vez identificado y confirmado el microorganismo como *E.coli* O157:H7 o *E.coli* O157/NM por propiedades bioquímicas y serología, determinar la producción de toxinas Stx1 y Stx2 o la presencia de los genes que codifican para las mismas.

NOTA: Las cepas aisladas deben ser enviadas al Centro de Referencia Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbrán”, para una mayor caracterización y determinación de los factores de virulencia.

3. DESARROLLO

3.1 Medios de cultivo, materiales, reactivos y equipos

- 3.1.1. Agua peptona bufferada modificada con piruvato (mBPWp) y suplemento acriflavina – cefsulodine – vancomicina (ACV).
- 3.1.2. Agar MacConkey sorbitol con cefixima-telurito (SMAC-CT)
- 3.1.3. Agar cromogénico selectivo para el aislamiento de *E.coli* O157. Ejemplo Rainbow agar O157 o equivalente. Para muestras con un alto contenido de flora acompañante, agregar 10 mg / l de novobiocina más 0.8 mg / l de telurito de potasio.
- 3.1.4. Agar tripticasa soja con extracto de levadura (TSAYE)
- 3.1.5. Buffer fosfato de Butterfield´s
- 3.1.6. Solución fisiológica salina (0.85 % de NaCl)
- 3.1.7. Reactivo de Kovacs para indol
- 3.1.8. ColiComplete Discs - Biocontrol (contiene sustrato fluorogénico MUG para Glucuronidasa y X-gal para Galactopiranosidasa)
- 3.1.9. Reactivo látex Anti O157 y anti H7. (Remel, Lenexa, KS, o equivalente)

- 3.1.10. Sistema para separación inmunomagnética: partículas inmunomagnéticas anti *E.coli* O157, separador magnético para concentración de partículas inmunomagnéticas, apto para usar con tubos de plástico tipo Eppendorf. (ejemplo Dynabeads o equivalente)
- 3.1.11. Buffer de lavado: buffer fosfato modificado, 0.01 mol/l de pH 7.2
- 3.1.12. Sistema de pruebas bioquímicas (API 20, VITEX GNI o equivalente)
- 3.1.13. Balanza de 1 g - 500 g, sensibilidad 0.1 g
- 3.1.14. Homogeneizador automático tipo Stomacher
- 3.1.15. Bolsas para Stomacher con filtro de capacidad adecuada.
- 3.1.16. Estufa de incubación a 36°C ± 1°C
- 3.1.17. Estufa de incubación a 42°C ± 1°C
- 3.1.18. Peachímetro: capaz de medir 0.01 unidad de pH, calibrado con exactitud de 0.1 unidad de pH a 25°C.
- 3.1.19. Tubos y frascos de capacidad adecuada para esterilización y almacenamiento de medios de cultivo e incubación de medios líquidos.
- 3.1.20. Pipetas graduadas o automáticas de 10 ml y 1 ml de capacidad nominal, graduadas en 0.5 ml y 0.1 ml respectivamente.
- 3.1.21. Ansa de platino o níquel.
- 3.1.22. Micropipetas: de 0.5 µl – 20 µl, 20 µl – 200 µl, 200 µl – 1000 µl
- 3.1.23. Tips para micropipetas de capacidad adecuada
- 3.1.24. Tubos para microcentrífuga de 2.0 ml de capacidad (tipo Eppendorf).
- 3.1.25. Mezclador rotativo capaz de rotar a 15 a 20 r/min.
- 3.1.26. Placas de Petri de 150 mm
- 3.1.27. Vórtex
- 3.1.28. Placas de vidrio para reacción de aglutinación
- 3.1.29. Papel de filtro

3.2 Principio

- 3.2.1. Enriquecimiento de la muestra en caldo mBPWp
- 3.2.2. Separación y concentración por medio de partículas inmunomagnéticas revestidas con anticuerpos anti *E. coli* O157. (OPCIONAL)
- 3.2.3. Tamizaje (screening por PCR Real-time) (OPCIONAL)
- 3.2.4. Siembra de diluciones del caldo mBPWp en agar SMAC-CT y agar cromogénico
- 3.2.5. Confirmación de colonias sospechosas por propiedades bioquímicas y serología

3.3. Procedimiento

3.3.1. Enriquecimiento

Vegetales de hoja: Agregar igual cantidad de Buffer fosfato de Butterfield's a 200 g de muestra (como mínimo) en una bolsa o recipiente estéril, agitar con la mano por 5 minutos. Pesar 125 g del líquido de enjuague y agregar 125 ml del caldo mBPWp doble concentración.

Jugos, leche y otras bebidas turbias: centrifugar asépticamente 200 ml de la muestra a 10000 x g durante 10 minutos. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 225 ml de mBPWp.

Agua embotellada y otras bebidas no turbias: pesar 125 ml de la muestra en 125 ml de caldo mBPWp doble concentración. Utilizar este procedimiento para los líquidos en los cuales no queda precipitado después de la centrifugación.

Otros Alimentos: Pesar 25 g de la muestra en 225 ml de mBPWp y agitar o llevar a Stomacher.

Incubar las muestras a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 5 horas, luego agregar 1 ml del suplemento ACV e incubar a $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ toda la noche (18 h a 24 h).

3.3.2. Separación Inmunomagnética (SIM) OPCIONAL

Cuando se sospecha que la muestra tiene un alto número de microflora acompañante, como en el caso de brotes o carne cruda, el uso de la SIM antes del método de tamizaje (screening) puede mejorar la recuperación de *E.coli* O157.

Realizar la SIM con el caldo de enriquecimiento después de 5 h de incubación o después de 18 h – 24 h, dependiendo del kit comercial utilizado.

3.3.3. Procedimiento para Kit marca Dynabeads anti-*E.coli* O157 y equipo Dynal MPC-S

El procedimiento de SIM debe realizarse a una temperatura ambiente de 15°C a 25°C y todos los reactivos deben estar a esa temperatura antes de su uso.

- 3.3.3.1. Colocar el número de tubos Eppendorf que sean necesarios en el Dynal MPC-S (concentrador magnético de partículas), sin el plato magnético.
- 3.3.3.2. Resuspender el vial de Dynabeads anti *E.coli* O157 hasta que desaparezca el pellet. Tomar con pipeta 20 μl y colocar en los tubos.
- 3.3.3.3. Agregar con pipeta 1 ml del preenriquecimiento. Cerrar la tapa.
- 3.3.3.4. Agitar en vórtex 15 segundos y luego invertir el Dynal MPC-S unas cuantas veces (aprox. 20 veces). Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos con suave y continua agitación para evitar depósitos. (Utilizar el mezclador rotativo)
- 3.3.3.5. Insertar el plato magnético, invertir varias veces hasta observar un botón en la pared que contacta el imán. Dejar en reposo 3 minutos.
- 3.3.3.6. Abrir los tubos utilizando el abridor, aspirar el sobrenadante con precaución de no desprender las perlas de la pared que contacta con el imán.
- 3.3.3.7. Remover el plato magnético.

- 3.3.3.8. Agregar 1 ml del Buffer PBS-Tween, cerrar la tapa, invertir el Dynal MPC-S unas cuantas veces para resuspender las perlas hasta homogeneizar la solución.
- 3.3.3.9. Repetir los pasos del 3.3.3.5 al 3.3.3.8
- 3.3.3.10. Repetir los pasos del 3.3.3.5 al 3.3.3.7
- 3.3.3.11. Resuspender las partículas en 100 µl de PBS-Tween usando el vórtex.

3.3.4. Tamizaje (screening por PCR Real-Time) OPCIONAL

En la técnica FDA-BAM se describe, como un paso opcional, la metodología para un tamizaje por PCR Real Time que se realiza a partir del caldo de enriquecimiento mBPWp incubado toda la noche, o del concentrado obtenido después de realizar la SIM (punto 3.3.2).

En este procedimiento no se incluye dicha metodología.

Para mayor información referirse a FDA - Bacteriological Analytical Manual, Capítulo 4A. Diarrheagenic Escherichia coli.

<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>

3.3.5. Siembra en agares selectivos

Sembrar las muestras (que dan un resultado positivo para la prueba de tamizaje, así como de las muestras que no fueron sometidas a un tamizaje) en los medios selectivos para el aislamiento de colonias. La siembra se realiza a partir del caldo de enriquecimiento mBPWp incubado toda la noche, o del concentrado obtenido en la SIM (punto 3.3.2)

3.3.5.1. A partir del caldo de enriquecimiento mBPWp incubado toda la noche (3.3.1) realizar diluciones decimales con buffer fosfato de Butterfield's, sembrar 50 µl en los agares selectivos y esparcir con espátula de Drigalsky. Generalmente, sembrando 50 µl de las diluciones 10^{-2} y 10^{-4} se obtiene un recuento de 100 a 300 colonias.

Sembrar por duplicado en agar SMAC-CT y en agar cromogénico para *E.coli* O157 .

NOTA: en forma opcional se pueden agregar placas sembradas por estriado con ansa.

3.3.5.2. Incubar las placas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 18 h – 24 h.

3.3.5.3. Observar las placas para seleccionar colonias sospechosas.

3.3.6. Selección de colonias típicas de *E.coli* O157

Las colonias típicas en el agar SMAC-CT son incoloras o grises, de 1 a 2 mm de diámetro. Las bacterias que fermentan el sorbitol, como la mayoría de las *E. coli*, producen colonias rosas.

Examinar el medio cromogénico para seleccionar las colonias típicas de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3.3.7. Prueba de aglutinación con látex anti O157

A partir de los agares de aislamiento (3.3.5.1) realizar la prueba de aglutinación con el reactivo látex Anti O157 picando una porción de cada una de las colonias sospechosas aisladas.

3.3.8. Aislamiento en agar TSAYE

Picar todas las colonias típicas que dieron una reacción positiva para la prueba de aglutinación con látex anti O157 (3.3.7) (hasta 10 colonias si hay más de 10 colonias presentes) y estriar en agar TSAYE para chequear la pureza.

3.3.9. Prueba para Glucuronidasa y Galactopiranosidasa

Colocar un disco de ColiComplete (CC) en la zona de mayor crecimiento en el agar TSAYE. Incubar las placas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, de 18 h a 37 h.

El kit CC tiene un ensayo cromogénico para Glucuronidasa (MUG) y Galactopiranosidasa (X-gal) en el mismo disco.

Preparar un TSAYE similar con una cepa de *E.coli* MUG positiva como control positivo.

Una reacción positiva se evidencia por color azul sobre el disco y alrededor del disco (indicativo de coliformes, X-gal +), y fluorescencia azul alrededor del disco observado bajo luz UV (365 nm) (indicativo de *E.coli*, MUG +).

Las cepas de *E.coli* O157 son X- gal (+) y MUG (-).

3.3.10. Prueba de la mancha de indol

A partir de las colonias aisladas en el agar TSAYE (3.3.8.) tomar una porción de crecimiento y depositarla sobre un papel de filtro humedecido con reactivo de Kovac. *E coli* O 157 da una reacción positiva.

3.3.11. Pruebas de confirmación

Para las colonias típicas que dieron X-gal (+), MUG (-) y la prueba de indol (+) realizar las siguientes pruebas de confirmación a partir de los aislamientos obtenidos en agar TSAYE:

Prueba de aglutinación con látex anti O157 y anti H7.

Confirmar la presencia de los antígenos O157 y H7 con el antisuero comercial siguiendo las instrucciones del fabricante.

- si el aislamiento da una reacción positiva para O157 y H7, es evidencia que el aislamiento presenta el serotipo O157:H7.
- si el aislamiento da O157 (+) y H7 (-), podría tratarse de una variante no móvil (O157: NM).

NOTA: en caso de dar serología negativa para H7, el aislamiento puede ser cultivado en agar sangre para inducir la movilidad y realizar nuevamente la prueba con el suero anti H7.

NOTA: Realizar los controles de autoaglutinación para descartar la posibilidad de cepas autoaglutinantes.

Pruebas bioquímicas:

Realizar identificación bioquímica de las cepas que dieron O157 y H7 positivo. Utilizar los kits de identificación bioquímica siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3.12. Identificación positiva

- Los aislamientos que dan sorbitol (-), indol (+), MUG (-), serología para O157 (+) y H7 (+) y son confirmadas como *E.coli* por propiedades bioquímicas se informan como: presencia de *E.coli* O157:H7 en la cantidad de muestra analizada.

- Los aislamientos que dan sorbitol (-), indol (+), MUG (-), serología para O157 (+) y H7 (-) y son confirmadas como *E.coli* por propiedades bioquímicas, se informan como: presencia de *E.coli* O157: NM en la cantidad de muestra analizada.

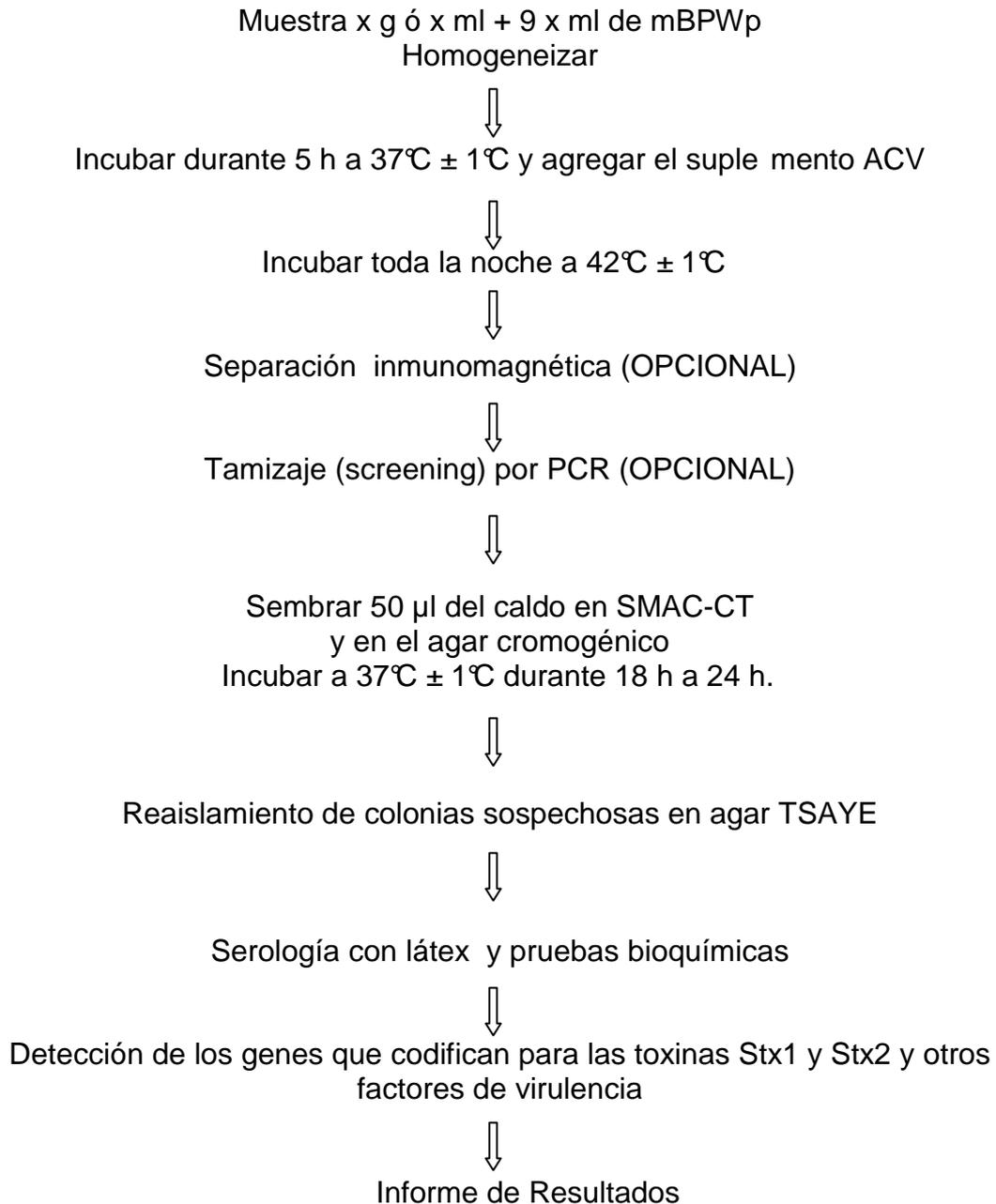
3.3.13. Detección de los factores de virulencia

Para las cepas identificadas como *E.coli* O157:H7 y *E.coli* O157: NM se debe determinar la presencia de los genes que codifican las toxinas Stx1 y Stx2 por PCR.

NOTA: Las cepas aisladas deben ser enviadas al Centro de Referencia Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbrán”, para una mayor caracterización y determinación de los factores de virulencia.

4. ANEXOS

ANEXO 1: Diagrama de flujo del procedimiento para la detección, aislamiento e identificación de *E.coli* O157:H7 en alimentos.



ANEXO 2: Medios de cultivos y reactivos

Para la preparación de reactivos y medios de cultivos se siguen las instrucciones dadas por el fabricante.

1. Agua peptona bufferada modificada con piruvato (mBPW) y suplemento acriflavina – cefsulodine – vancomicina (ACV)

1.1 medio base

Peptona	10.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Disodio hidrógeno fosfato dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	3.6 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH_2PO_4)	1.5 g
Casaminoácidos	5.0 g
Extracto de levadura	6.0 g
Lactosa	10.0 g
Piruvato de sodio	1.0 g
Agua destilada	1000 ml

NOTA: Para la preparación del caldo doble concentración utilizar 500 ml de agua destilada en lugar de 1000 ml.

Se pueden sustituir los 4 primeros ingredientes por la fórmula comercial.

Disolver los componentes en agua destilada, calentando si es necesario.

Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor de 7.2 ± 0.2 a 25°C , después de la esterilización.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos .

1.2 Suplemento acriflavina – cefsulodine – vancomicina (ACV)

Acriflavina	10.0 mg
Cefsulodina	10.0 mg
Vancomicina	8.0 mg
Caldo base (1.1)	1000 ml

Para acriflavina y cefsulodine preparar una solución stock de 1.125 g en 500 ml de agua destilada, y para vancomicina 0.9 g en 500 ml de agua destilada. Esterilizar por filtración y agregar 1 ml de cada solución a 225 ml del medio base (1.1).

2. Agar MacConkey sorbitol con cefixima-telurito (SMAC-CT)

2.1 Medio base

Peptona	17.0 g
Proteasa peptona nº3 o polipeptona	3.0 g
Sorbitol	10.0 g
Sales biliares	1.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Rojo neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.001 g
Agar	13.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada calentando hasta ebullición. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor de 7.1 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

2.2 Solución de telurito de potasio

Telurito de potasio de uso bacteriológico	0.25 g
Agua destilada	100 ml

Disolver el telurito de potasio en agua y esterilizar por filtración. Esta solución se puede guardar a temperatura ambiente hasta 1 mes, sin embargo se debe descartar si se observa formación de precipitado blanco.

2.3 Solución de cefixima

Cefixima	5.0 g
Agua destilada	100 ml

Disolver la cefixima en agua y esterilizar por filtración.
Nota: puede ser necesario disolver la cefixima en etanol.
Esta solución se puede guardar a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante una semana.

2.4 Medio completo

Medio base (3.1)	1000 ml
Solución de telurito de potasio (3.2)	1.0 ml
Solución de cefixima (3.3)	1.0 ml

Enfriar el medio base entre 44°C a 47°C . Agregar 1 ml de la solución de telurito de potasio y 1 ml de la solución de cefixima a 1000 ml del medio base. Mezclar, y verter 15 ml en una placa de Petri, dejar solidificar.

La concentración final de telurito de potasio es de 2.5 mg/l y la de cefixima es de 0.05 mg/l

Si se preparan con anticipación, las placas sin secar se pueden guardar en la oscuridad en bolsa de plástico u otro contenedor que conserve la humedad en refrigeración a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 2 semanas.

3. Agar cromogénico selectivo para el aislamiento de *E. coli* O157:
(Ej. Rainbow agar O157 o equivalente)

Seguir especificaciones del fabricante

4. Agar tripticasa soja con extracto de levadura (TSAYE) al 0.6 %

4.1 Agar tripticasa soja (TSA)

Tripticasa peptona	15.0 g
Fitopeptona	5.0 g
NaCl	5.0 g
agar	15.0 g

4.2 Agar tripticasa soja con extracto de levadura (TSAYE) al 0.6 %

Agar Tripticasa soja (TSA)	40.0 g
Extracto de levadura	6.0 g
Agua	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada, calentando si es necesario. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 7.3 ± 0.2 a 25°C , después de la esterilización. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar el medio entre 44°C a 47°C y verter 15 ml en una placa de Petri, dejar solidificar.

5. Buffer fosfato de Butterfield's

Potasio dihidrógeno fosfato (KH_2PO_4)	34.0 g
Agua destilada	500 ml
pH final a 25°C 7.5 ± 0.2	

Disolver los componentes en agua destilada, ajustar el pH a 7.2 ± 0.2 con NaOH 1N. Llevar a volumen final de 1000 ml con agua destilada. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Conservar en heladera

6. Reactivo de Kovacs para la reacción de indol

Alcohol amílico o isoamílico	150 ml
p-dimetilamino-benzaldehído	10.0 g
HCl (concentrado)	50 ml

Disolver el aldehído en el alcohol. Agregar lentamente el ácido a la muestra aldehído-alcohol.

Proteger de la luz en un frasco de vidrio de color marrón y guardar en refrigeración a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. El reactivo debe mantener un color de amarillo a marrón claro, libre de precipitado.

7. Partículas inmunomagnéticas anti *E.coli* O157

Son partículas recubiertas con anticuerpos específicos anti *E. coli* O157 para concentración y separación de este microorganismo.

En el comercio hay disponibles diferentes kits. Seguir las instrucciones dadas por el fabricante en cada caso.

8. Buffer de lavado: buffer fosfato modificado, 0.01 mol/l, pH 7.2

Cloruro de sodio	8.0 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Fosfato ácido disódico anhidro	1.44 g
Fosfato diácido monopotásico	0.24 g
Tween 20	0.2 ml
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada, ajustar si es necesario el pH a 7.2 ± 0.2 a 25°C . Fraccionar en frasco de volumen apropiado y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

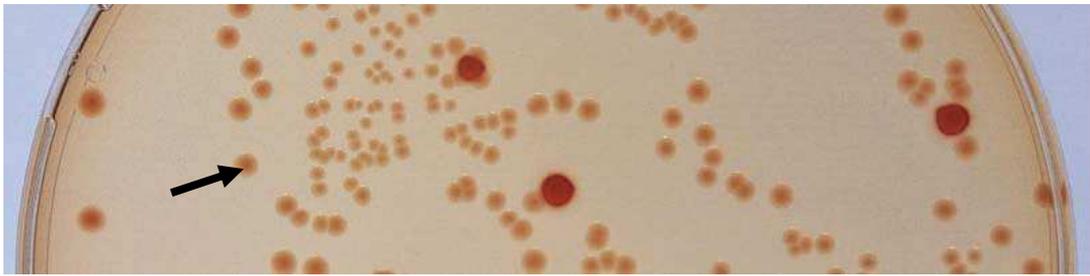
9. Solución salina fisiológica

Cloruro de sodio (NaCl)	8.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver el NaCl en agua destilada llevando a ebullición. Ajustar el pH si es necesario, para obtener un valor de 7.0 ± 0.2 a 25°C , después de la esterilización. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

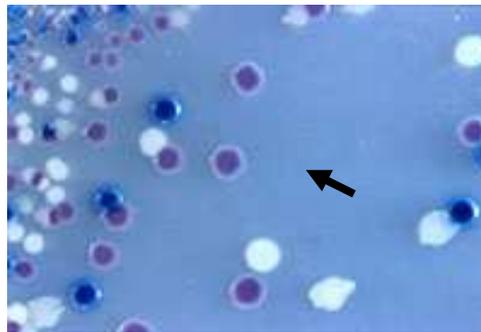
ANEXO 3: Fotos

1. Agar Mac Conkey sorbitol con cefixima telurito (SMAC-CT)



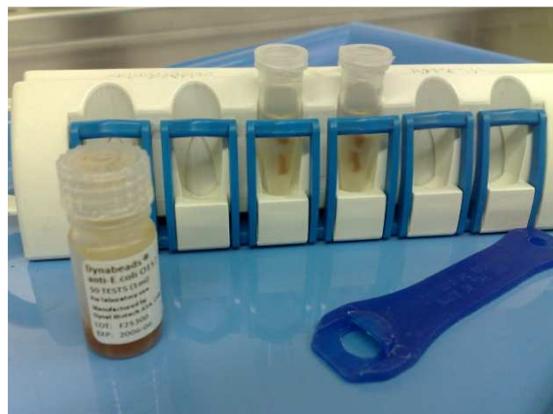
E. coli O157:H7: colonias típicas transparentes a incoloras de 1 mm de diámetro.

2. Agar Medio cromogénico (“Chromagar”)

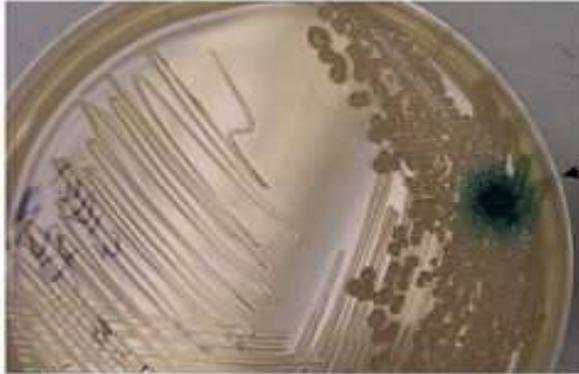


E. coli O157:H7: colonias típicas de color malva

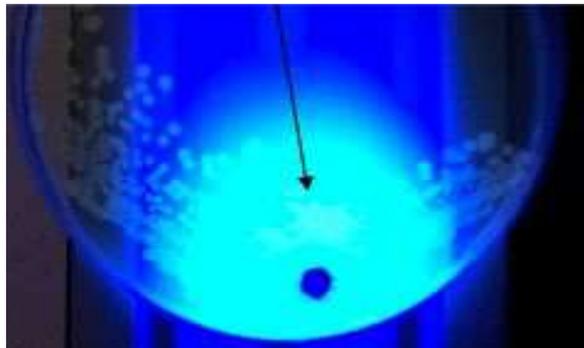
3. Equipo para concentración inmunomagnética



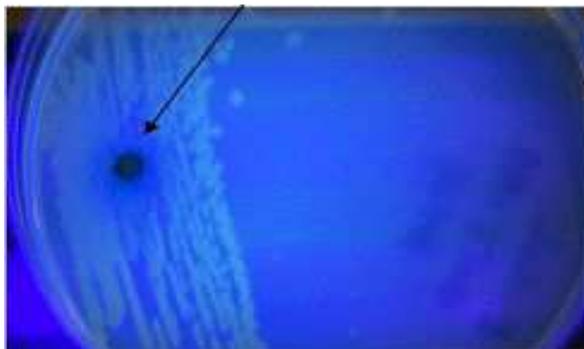
4. Resultados de discos ColiComplete (CC) para *E. coli* O157:H7 y *E. coli*



E. coli O157:H7 y *E. coli* son galactopiranosidasa (X-gal) positivas y producen coloración azul que rodea al disco CC.



E. coli es glucuronidasa (MUG) positiva y muestra fluorescencia alrededor del disco CC a 365 nm.



E. coli O157:H7 es glucuronidasa (MUG) negativa y no muestra fluorescencia alrededor del disco CC.

5. REFERENCIAS

FDA – Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4a. Diarrheagenic *Escherichia coli*. February 2011.

Detección de *Escherichia coli* O157:H7/NM en alimentos

(Procedimiento según International Standard ISO 16654:2001)

1. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar la detección, aislamiento e identificación de *E.coli* O157 en alimentos.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica para realizar la detección, aislamiento e identificación de *E.coli* O157 en alimentos.

Una vez identificado y confirmado el microorganismo como *E.coli* O157 por propiedades bioquímicas y serología, determinar la producción de toxinas Stx1 y Stx2 o la presencia de los genes que codifican para las mismas.

NOTA: Las cepas aisladas deben ser enviadas al Centro de Referencia Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbrán”, para una mayor caracterización y determinación de los factores de virulencia.

3. DESARROLLO

3.1 Medios de cultivo, materiales, reactivos y equipos

- 3.1.1. Caldo triptona soja modificado con novobiocina (TSBm+n)
- 3.1.2. Agar MacConkey sorbitol con cefixima-telurito (SMAC-CT)
- 3.1.3. Segundo medio de aislamiento selectivo: a elección del laboratorio, complementario al SMAC-CT y adecuado para el aislamiento de *E.coli* O157
- 3.1.4. Agar nutritivo (AN)
- 3.1.5. Medio de triptona / triptofano
- 3.1.6. Reactivo de Kovacs para indol
- 3.1.7. Partículas inmunomagnéticas anti *E.coli* O157
- 3.1.8. Buffer de lavado: buffer fosfato modificado, 0.01 mol/l de pH 7.2
- 3.1.9. Solución salina
- 3.1.10. Antisuero *E. coli* O157 disponible en el comercio como separado somático “O” 157
- 3.1.11. Suero anti H7 (si está disponible en el comercio)
- 3.1.12. Kit para la detección de toxinas Shiga disponibles en el comercio (seguir las indicaciones establecidas por el fabricante)

- 3.1.13. Balanza, sensibilidad 0.1 g
- 3.1.14. Homogeneizador automático tipo Stomacher
- 3.1.15. Bolsas para Stomacher con filtro
- 3.1.16. Estufa de esterilización
- 3.1.17. Autoclave
- 3.1.18. Horno o cabina de secado, ventilada por convección, capaz de operar entre 25°C y 50°C
- 3.1.19. Estufa de incubación a 37°C ± 1°C
- 3.1.20. Estufa de incubación a 41.5°C ± 1°C
- 3.1.21. Baño de agua: capaz de mantener la temperatura entre 44°C y 47°C.
- 3.1.22. Peachímetro: capaz de medir 0.01 unidad de pH, calibrado con exactitud de ± 0.1 unidad de pH a 25°C.
- 3.1.23. Tubos y frascos de capacidad adecuada para esterilización y almacenamiento de medios de cultivo e incubación de medios líquidos.
- 3.1.24. Pipetas graduadas o automáticas de 10 ml y 1 ml de capacidad nominal, graduadas en 0.5 ml y 0.1 ml respectivamente.
- 3.1.25. Ansa y ansa aguja de platino o níquel.
- 3.1.26. Pipetas automáticas de 20 µl a 200 µl, con divisiones de 10 µl o similar.
- 3.1.27. Separador magnético para concentración de partículas inmunomagnéticas, apto para usar con tubos de plásticos tipo Eppendorf.
- 3.1.28. Tubos de plástico tipo Eppendorf, estériles, descartables de 1.5 ml de capacidad.
- 3.1.29. Mezclador rotativo capaz de rotar a 15 a 20 r/min.
- 3.1.30. Placas de Petri de 90 mm y 140 mm
- 3.1.31. Vórtex
- 3.1.32. Placas de vidrio para reacción de aglutinación

3.2 Principio

El método está basado en 4 etapas:

- 3.2.1. Enriquecimiento de la porción de la muestra en caldo triptona soja modificado con novobiocina (TSBm+n) con incubación a 41.5°C ± 1°C durante 6 h y posteriormente 12 h a 18 h más.
- 3.2.2. Separación y concentración del microorganismos por medio de partículas inmunomagnéticas revestidas con anticuerpos anti *E. coli* O157.
- 3.2.3. Aislamiento por subcultivo de las partículas inmunomagnéticas con la bacteria adherida en agar MacConkey Sorbitol con cefixima telurito (SMAC-CT) y en el segundo agar selectivo de aislamiento a elección del laboratorio.
- 3.2.4. Confirmación de las colonias sorbitol negativas del SMAC-CT y de las colonias típicas del segundo agar de aislamiento por producción de indol y por aglutinación con el antisuero *E.coli* O157.

3.3. Procedimiento

3.3.1. Enriquecimiento

Pesar x g o x ml de la muestra, colocar en una bolsa de Stomacher, agregar 9 x ml (para obtener una dilución 1/10) de caldo TSBm+n precalentado en estufa a 41.5°C ±1 °C, y homogeneizar durante 2 minutos en Stomacher. Incubar a 41.5°C ± 1°C durante 6 h y posteriormente 12 a 18 h más (tiempo total de incubación de 18h a 24 h.)

NOTA: una incubación de 6 h seguida de separación inmunomagnética y siembra en los agares selectivos, puede dar un resultado positivo presuntivo, que puede resultar negativo a las 18 h de incubación.

3.3.2. Separación Inmunomagnética (SIM)

La SIM debe ser realizada después de las 6 h de incubación, y luego si el resultado es negativo, después de las 12 h a 18 h de incubación. Seguir las instrucciones del fabricante para el kit de SIM y aparato utilizado.

3.3.3. Procedimiento para Kit marca Dynabeads anti-*E.coli* O157 y equipo Dynal MPC-S

El procedimiento de SIM debe realizarse a una temperatura ambiente de 15°C a 25°C y todos los reactivos deben estar a esa temperatura antes de su uso.

- 3.3.3.1. Colocar el número de tubos Eppendorf que sean necesarios en el Dynal MPC-S (concentrador magnético de partículas), sin el plato magnético.
- 3.3.3.2. Resuspender el vial de Dynabeads anti *E.coli* O157 hasta que desaparezca el pellet. Tomar con pipeta 20 µl y colocar en los tubos.
- 3.3.3.3. Agregar con pipeta 1 ml del preenriquecimiento. Cerrar la tapa.
- 3.3.3.4. Agitar en vórtex 15 segundos y luego invertir el Dynal MPC-S unas cuantas veces (aproximadamente 20 veces). Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos con suave y continua agitación para evitar depósitos (utilizar el mezclador rotativo).
- 3.3.3.5. Insertar el plato magnético, invertir varias veces hasta observar un botón en la pared que contacta el imán. Dejar en reposo 3 minutos.
- 3.3.3.6. Abrir los tubos utilizando el abridor, aspirar el sobrenadante con precaución de no desprender las perlas de la pared que contacta con el imán.
- 3.3.3.7. Remover el plato magnético.
- 3.3.3.8. Agregar 1 ml del Buffer PBS-Tween, cerrar la tapa, invertir el Dynal MPC-S unas cuantas veces para resuspender las perlas hasta homogeneizar la solución.
- 3.3.3.9. Repetir los pasos del 3.3.3.5 al 3.3.3.8
- 3.3.3.10. Repetir los pasos del 3.3.3.5 al 3.3.3.7
- 3.3.3.11. Resuspender las partículas en 100 µl de PBS-Tween usando el vórtex.

3.3.4. Siembra en agares selectivos

Dispensar con pipeta automática 50 µl de las partículas concentradas 3.3.3.11. en una placa de CT-SMAC y 50 µl de las partículas concentradas en una placa del segundo medio de aislamiento. Estriar con un ansa para obtener colonias bien aisladas. Incubar las placas de CT-SMAC a 37°C durante 18 h a 24 h y las placas del segundo medio de aislamiento de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

NOTA: Dependiendo del tipo de alimento y su flora microbiológica la incubación del caldo de enriquecimiento por 20 h a 24 h puede aumentar el crecimiento de otras bacterias en los agares selectivos dificultando el aislamiento de *E.coli* O157.

La inoculación de los medios selectivos con diluciones de las partículas concentradas o con la siembra de un volumen menor a 50 µl puede aumentar la posibilidad de obtener colonias aisladas de *E.coli* O157, aunque esto puede aumentar también el límite de detección de la técnica.

3.3.5. Selección de colonias típicas de *E.coli* O157

Las colonias típicas en el agar SMAC-CT son transparentes a incoloras de 1 mm de diámetro. Examinar el segundo medio de aislamiento para seleccionar las colonias típicas de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3.3.6. Confirmación

Seleccionar 5 colonias típicas (si hay menos de 5 colonias, seleccionar todas) en cada placa, y estriar cada una en una placa de agar nutritivo para obtener colonias aisladas. Incubar de 18 h a 24 h a 37°C.

3.3.7. Confirmación bioquímica

Inocular una colonia aislada de cada agar nutritivo en un tubo con caldo triptona /triptofano e incubar a 37°C por 24 h. Agregar 1 ml de reactivo de Kovacs y dejar a temperatura ambiente 10 minutos.

Reacción positiva: formación de color rojo

Reacción negativa: color amarillo/marrón.

3.3.8. Confirmación serológica

Realizar la confirmación serológica sólo de las colonias indol positivas.

3.3.8.1. Eliminación de cepas autoaglutinantes

- Colocar una gota de solución salina en una placa de vidrio
- Con un ansa colocar una colonia aislada obtenida en el agar nutritivo y homogeneizar hasta obtener una suspensión homogénea.
- Rotar la placa suavemente entre 30 a 60 segundos.
- Observar el resultado contra un fondo negro y si es necesario, con una lupa.

Si se produce aglutinación, la cepa es considerada autoaglutinante y no es posible realizar la reacción con el antisuero específico.

3.3.8.2. Reacción con el antisuero *E. coli* O157

- Colocar una gota de solución salina en una placa de vidrio
- Con un ansa colocar una colonia aislada obtenida en el agar nutritivo y agregar una pequeña gota del antisuero *E. coli* O157
- Rotar la placa suavemente entre 30 a 60 segundos.
- Observar el resultado contra un fondo negro y si es necesario, con una lupa.
- Si se produce aglutinación dentro del minuto se considera una reacción positiva

3.3.9. Identificación positiva

Se considera aislamiento positivo el que da la reacción del indol positiva y la reacción con el antisuero *E. coli* O157 o con el antisuero O157 y H7 (si está disponible) positiva

3.3.10. Detección de las toxinas Stx1 y Stx2 y/o de la presencia de los genes que codifican las mismas

Para la detección de las toxinas Stx1 y Stx2 utilizar kits disponibles en el comercio (seguir las especificaciones indicadas por el fabricante), o determinar los genes que codifican para las mismas por PCR.

3.3.11. Mayor caracterización

Las cepas aisladas deben ser enviadas al Centro de Referencia Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbrán”, para una mayor caracterización y determinación de los factores de virulencia.

3.3.12. Control de Calidad

3.3.12.1. Cepa Control

Cepas de *E. coli* O 157 sin factores de virulencia que atribuyen su patogenicidad están disponibles en Colecciones de Cultivos nacionales o internacionales. Se recomienda la utilización de este tipo de cepas para el control de calidad de los medios de cultivos y antisueros.

3.3.12.2. Método de cultivo

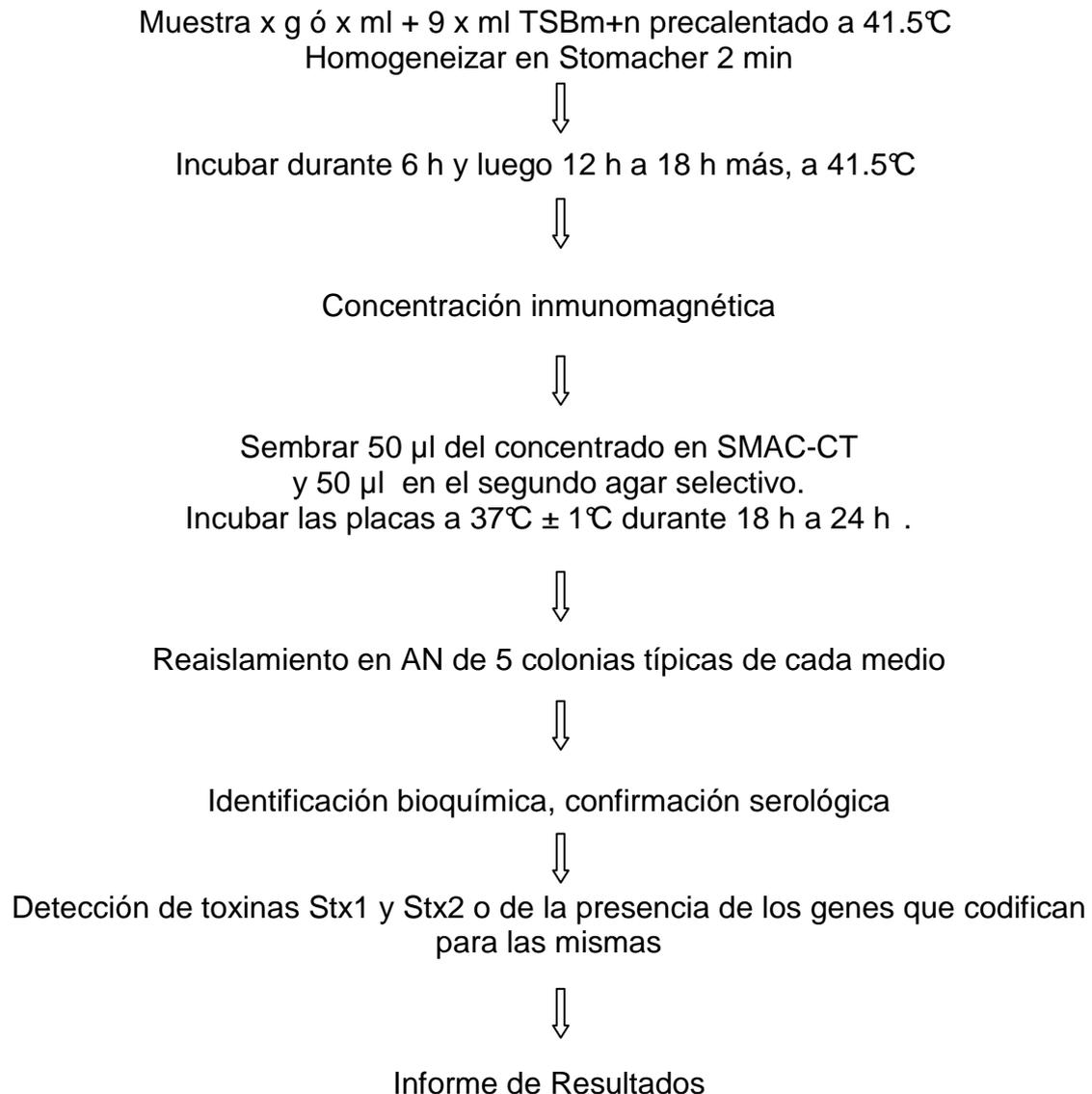
Para chequear la capacidad del laboratorio y de los medios de cultivos para detectar un bajo número de *E.coli* O157 en la muestra de alimento analizada, analizar en forma paralela una muestra contaminada con un bajo inóculo de *E. coli* O157 no patogénica y un alto inóculo de otra cepa de *E. coli*.

3.3.13. Expresión de los resultados

De acuerdo a la interpretación de los resultados, informar como ausencia o presencia de *E. coli* O157 en la porción de muestra analizada, expresada en gramos o mililitros.

4. ANEXOS

ANEXO 1: Diagrama de Flujo del procedimiento para la detección, aislamiento e identificación de *E.coli* O157 en alimentos



ANEXO 2: Medios de cultivos y reactivos

Para la preparación de reactivos y medios de cultivos se siguen las instrucciones dadas por el fabricante.

1. Caldo Triptosa Soja modificado con novobiocina (TSBm+n)

Digestivo enzimático de caseína	17.0 g
Digestivo enzimático de soja	3.0 g
D(+) glucosa	2.5 g
Sales biliares N°3	1.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Dipotasio hidrógeno fosfato (K ₂ HPO ₄)	4.0 g
Agua destilada	1000 ml
pH final a 25°C 7.4 ± 0.2	

Disolver los componentes en agua destilada, calentando si es necesario. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 7.4 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización.

Fraccionar en frascos en cantidades adecuadas.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos .

Después de autoclavado y enfriado a aproximadamente 50°C, agregar en condiciones de esterilidad la novobiocina, para obtener una concentración final de 20 mg/l de medio (5 ml de la solución stock, de concentración 4 mg/ml en un litro de medio).

1.1. Solución Stock de Novobiocina (4 mg/ml)

Disolver la cantidad necesaria de novobiocina sódica en agua destilada para llegar a una solución de concentración de 4 mg/ml (ajustar de acuerdo a la potencia). Esterilizar por filtración, y conservar a 4°C durante 30 días en frasco oscuro, al resguardo de la luz.

2. Agar MacConkey Sorbitol con Cefixima-Telurito

2.1 Medio base

Digestivo enzimático de caseína	17.0 g
Digestivo enzimático de tejido animal	3.0 g
Sorbitol	10.0 g
Sales biliares	1.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Rojo neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.001 g
Agar	de 9 a 18* g
Agua destilada	1000 ml
pH final a 25°C 7.1 ± 0.2	

*Dependiendo de la fuerza gelificante del agar

Disolver los componentes en agua destilada calentando hasta ebullición. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 7.1 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos .

2.2 Solución de telurito de potasio

Telurito de potasio de uso bacteriológico	0.25 g
Agua destilada	100 ml

Disolver el telurito de potasio en agua y esterilizar por filtración

Esta solución se puede guardar a temperatura ambiente hasta 1 mes, sin embargo se debe descartar si hay formación de precipitado blanco.

2.3 Solución de cefixima

Cefixima	5.0 g
Agua destilada	100 ml

Disolver la cefixima en agua y esterilizar por filtración

Nota: puede ser necesario disolver la cefixima en etanol

Esta solución se puede guardar a 3°C ± 2°C durante una semana.

2.4 Medio completo

Medio base (2.1)	1000 ml
Solución de telurito de potasio (2.2)	1.0 ml
Solución de cefixima (2.3)	1.0 ml

Enfriar el medio base entre 44°C a 47°C. Agregar 1 ml de la solución de telurito potasio y 1 ml de la solución de cefixima a 1000 ml del medio base. Mezclar y verter 15 ml en una placa de Petri. Dejar solidificar.

La concentración final de telurito de potasio es de 2.5 mg/l y la de cefixima es de 0.05 mg/l.

Inmediatamente antes del uso, secar las placas preferiblemente sin tapa, y con la superficie del agar hacia abajo, en estufa entre 25°C y 50°C hasta que desaparezcan las gotas de agua de la superficie del medio. No secar por más tiempo. Las placas también se pueden secar en cabina de flujo laminar por 30 minutos con la mitad de la tapa abierta, o durante toda la noche a temperatura ambiente, con la tapa cerrada.

Si se preparan con anticipación, las placas sin secar se pueden guardar en la oscuridad, en bolsa de plástico u otro contenedor que conserve la humedad, en refrigeración a 3°C ± 2°C durante 2 semanas.

3. Segundo medio selectivo de aislamiento para *E. coli* O157

Utilizar otro agar selectivo de aislamiento a elección del laboratorio que sea complementario al SMAC-CT, y especialmente apropiado para el aislamiento de *E. coli* O157. (ej. un agar cromogénico específico para *E. coli* O157).

Inmediatamente antes del uso secar las placas preferiblemente sin tapa, y con la superficie del agar hacia abajo, en estufa entre 25°C a 50°C, hasta que desaparezcan las gotas de agua de la superficie del medio. No secar por más tiempo. Las placas también se pueden secar en cabina de flujo laminar por 30 minutos, con la mitad de la tapa abierta, o durante toda la noche a temperatura ambiente con la tapa cerrada.

Si se prepara con anticipación, las placas sin secar se pueden guardar en la oscuridad en bolsa de plástico u otro contenedor que conserve la humedad, en refrigeración a 3°C ± 2°C durante 2 semanas.

4. Agar nutritivo

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	5.0 g
Agar	9 g a 18 g*
Agua	1000 ml

*dependiendo de la fuerza gel del agar

Disolver los componentes en agua destilada calentando si es necesario. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 7.0 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Enfriar el medio entre 44°C a 47°C y verter 15 ml en una placa de Petri. Dejar solidificar.

Inmediatamente antes del uso secar las placas preferiblemente sin tapa, y con la superficie del agar hacia abajo en estufa entre 25°C a 50°C hasta que desaparezcan las gotas de agua de la superficie del medio. No secar por más tiempo. Las placas también se pueden secar en cabina de flujo laminar por 30 minutos con la mitad de la tapa abierta, o durante toda la noche a temperatura ambiente con la tapa cerrada.

Si se preparan con anticipación, las placas sin secar, se pueden guardar en la oscuridad en bolsa de plástico u otro contenedor, que conserve la humedad en refrigeración a 3°C ± 2°C durante 2 semanas.

5. Solución de Triptona / Triptofano

Triptona	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
DL triptofano	1.0 g
Agua destilada	1000 ml
pH final a 25°C 7.5 ± 0.2	

Disolver los componentes en agua destilada llevando a ebullición, si es necesario. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 7.5 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización.

Fraccionar 5 ml en tubos y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

6. Reactivo de Kovacs para la reacción de indol

Alcohol amílico o isoamílico	150 ml
p-dimetilamino-benzaldehído	10.0 g
HCl (concentrado)	50 ml

Disolver el aldehído en el alcohol. Agregar lentamente el ácido a la muestra aldehído-alcohol.

Proteger de la luz en un frasco de vidrio de color marrón, y guardar en refrigeración a 3°C ± 2°C. El reactivo debe mantener un color de amarillo a marrón claro, libre de precipitado.

7. Partículas inmunomagnéticas anti *E.coli* O157

Son partículas recubiertas con anticuerpos específicos anti *E. coli* O157 para concentración y separación de éste microorganismo.

En el comercio hay disponibles diferentes kits. Seguir las instrucciones dadas por el fabricante en cada caso.

8. Buffer de lavado: buffer fosfato modificado, 0.01 mol/l, pH 7.2

Cloruro de sodio	8.0 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Fosfato ácido disódico anhidro	1.44 g
Fosfato diácido monopotásico	0.24 g
Tween 20	0.2 ml
Agua destilada	1000 ml
pH final a 25°C 7.3 ± 0.2	

Disolver los componentes en agua destilada, ajustar si es necesario el pH a 7.2 ± 0.2 a 25°C. Fraccionar en frasco de volumen apropiado, y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

9. Solución salina fisiológica

Cloruro de sodio (NaCl)	8.5 g
Agua destilada	1000 ml

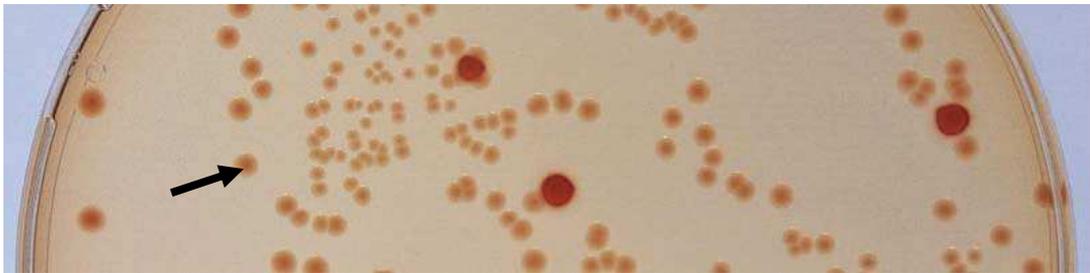
Disolver el NaCl en agua destilada llevando a ebullición. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 7.0 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

10. Antisuero específico para *E. coli* O157

Disponible en laboratorios específicos o en el comercio como antígeno somático "O" 157. El antisuero debe ser chequeado con controles.

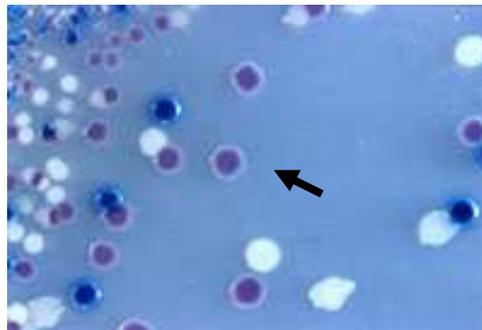
ANEXO 3: Fotos

1. Agar Mac Conkey sorbitol con cefixima telurito (SMAC-CT)



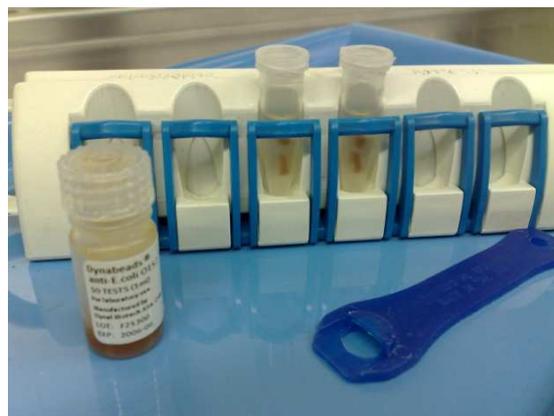
E.coli O157:H7: colonias típicas transparentes a incoloras de 1 mm de diámetro.

2. Agar Medio cromogénico (“Chromagar”)



E.coli O157:H7: colonias típicas de color malva

3. Equipo para concentración inmunomagnética



4. REFERENCIAS

International Standard. ISO 16654. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157. First edition. 2001.05.01.

Listeria monocytogenes en alimentos

1. Generalidades

Listeria monocytogenes es una bacteria Gram positiva y catalasa positiva, anaerobia facultativa, no esporógena, con forma de bacilos cortos, a veces cocoides. Su tamaño consiste entre 0,5 a 2 micras de largo por 0,5 micras de ancho. Este microorganismo presenta como particularidad una motilidad tipo “tumbling” a los 20 - 25°C pero es inmóvil a los 35°C. Cuando se observan las colonias a la luz oblicua (iluminación de Henry) poseen apariencia azulada-gris a verde. Es un microorganismo psicótrofo y su rango de crecimiento oscila entre 0°C a 45°C siendo las condiciones óptimas entre 30°C y 37°C. Puede crecer a niveles de pH entre 4,4 y 9,4 y con una actividad de agua (a_w) $\geq 0,90$. Tolerancia concentraciones de NaCl de hasta 20%. Se conocen 6 especies del género *Listeria* de las cuales *L. innocua* y *L. grayi* se consideran no patógenas, mientras *L. seeligeri*, *L. ivanovii* y *L. welshimeri* raramente causan infección en humanos. De esta manera *L. monocytogenes* permanece como la especie más importante, destacándose además su capacidad de producir β -hemólisis en agar sangre.

Listeria monocytogenes es una bacteria oportunista. Puede multiplicarse fuera del huésped aún con bajas exigencias en cuanto a nutrientes. Comparada con otras bacterias patógenas que no producen esporas y que son transmitidas por los alimentos, *Listeria monocytogenes* presenta la particularidad de resistir distintas condiciones de estrés como congelación, secado, acidez y frío, pudiéndose adaptar a éstas mediante la producción de biofilms. [1] [5]

2. Características de la enfermedad

Se denomina listeriosis a la enfermedad producida por este microorganismo, y ocurre usualmente vía intestinal. La enfermedad puede manifestarse de manera no invasiva, también conocida como gastroenteritis febril leve, con aparición de los siguientes síntomas: diarrea, náuseas, fiebre, dolor de cabeza, fatiga y mialgia dentro de las 9 a 32 hs.

También puede ocurrir como enfermedad invasiva en adultos y embarazadas produciendo meningitis, septicemia y abortos, como algunas de las características más importantes. En la forma invasiva los síntomas aparecen entre las 2 y 6 semanas y se asocia con la población inmunocomprometida, recién nacidos, fetos, mujeres embarazadas, ancianos y enfermos terminales. Existen 13 serovariedades, pero solamente 3 de ellas (4b, 1/2a y 1/2b) están relacionadas con la listeriosis humana. De todos modos, *Listeria monocytogenes* se detecta en las heces de aproximadamente un 5% de la población sana. [1] [5]

3. Epidemiología

Los datos epidemiológicos disponibles muestran que se dan tanto casos esporádicos como brotes de listeriosis invasiva, siendo los esporádicos la causa de la mayoría de los casos.

La listeriosis invasiva es una enfermedad relativamente poco común pero habitualmente grave, con una frecuencia típica de 3 a 8 casos por cada 1.000.000 de personas, y tasas de mortalidad del 20% al 30% de los pacientes hospitalizados. Durante los últimos años, la frecuencia de la listeriosis se ha mantenido constante en la mayoría de los países; varios países han informado una reducción en la frecuencia de los casos.

La incidencia anual de casos por listeriosis es muy baja. Por ejemplo en Europa los casos varían entre 0,3 y 7,5 por millón de personas (6,2 casos por millón de habitantes en Alemania en 2005), y 3 casos por millón en Australia. Según datos del CDC en el año 2008 la incidencia fue de 0.29 casos por 100.000 habitantes en Estados Unidos de América. La listeriosis presenta un cuadro severo, lo que hace que las personas afectadas busquen atención médica. De esta manera, y como en Estados Unidos, la listeriosis es una enfermedad de notificación obligatoria. El Centers for Disease Control and Prevention (CDC) estima que se identifican aproximadamente la mitad de todos los casos de listeriosis de ese país. [3] [4] [6]

4. Reservorio y fuentes de infección

Listeria monocytogenes se encuentra ampliamente distribuida en el medio ambiente y ha sido aislada de varios tipos de fuentes como por ejemplo suelos, vegetación, ensilados, materia fecal animal y humana, agua, desperdicios, aguas cloacales. También los alimentos relacionados con la listeriosis han sido, en su gran mayoría, productos listos para el consumo que generalmente se conservan durante largos períodos a temperaturas de refrigeración. Algunos ejemplos de alimentos capaces de provocar una enfermedad transmitida por alimentos (ETA) causada por *Listeria monocytogenes* son: quesos, helados, vegetales crudos, alimentos cárnicos y de origen marino, tanto crudos como cocidos y, como ya se mencionó, alimentos listos para el consumo. Es común la presencia de éste microorganismo en plantas de elaboración de alimentos, en donde puede permanecer en ambientes y superficies húmedas. Como se trata de un microorganismo capaz de desarrollarse a bajas temperaturas puede persistir por largos períodos de tiempo en alimentos, utensilios y equipos, como por ejemplo heladeras y cámaras de frío. También es capaz de sobrevivir en condiciones de congelamiento a -18°C durante varias semanas, en distintas matrices alimentarias. [1] [5]

4. Prevención

Las recomendaciones para la prevención de alimentos contaminados por *Listeria monocytogenes* están vinculadas a la naturaleza de la bacteria, su medio y su resistencia a varias condiciones medioambientales. Por lo tanto deberá prestarse especial atención a la cocción de los alimentos crudos de origen animal, el lavado cuidadoso de las hortalizas y hierbas aromáticas crudas, la remoción de la capa dura de los quesos y a los productos listos para el consumo los cuales no han sido sometidos a un tratamiento listericida como ser un tratamiento térmico.

Asimismo, deberán cocinarse bien las carnes molidas y adoptar medidas que permitan la reducción del riesgo de la contaminación cruzada, tales como el almacenamiento de los alimentos crudos (carne, hortalizas, etc.) separados de los alimentos cocidos o listos para el consumo, y el lavado de las manos y utensilios de la cocina después de manipular los alimentos crudos.

Finalmente, otras recomendaciones más generales son: lavar y desinfectar la heladera con regularidad usando agua con cloro, controlar el funcionamiento de la misma a 4°C, observar la fecha de vencimiento de los alimentos y evitar las “ventas especiales” ofrecidas cerca del final del tiempo de conservación. [1] [6]

Referencias:

1. Microorganisms in Food, Microbiological Specifications of Food Pathogens. Chapter 8, *Listeria monocytogenes*, p. 141, ICMSF, 1996.
2. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo: Resumen Interpretativo. Serie de Evaluación de Riesgos Microbiológicos N° 4 - FAO/OMS (2004).
3. Summary of Notifiable Diseases in the United States, 2008, Morbidity and Mortality Weekly Report. Centers for Disease Control and Prevention.
http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5754a1.htm?s_cid=mm5754a1_w
4. Koch J, Stark K. Significant Increase of Listeriosis in Germany - Epidemiological patterns 2001-2005. p. 631, Euro Surveill, 2006; 11(6).
5. E.T. Ryser, C.W. Donnelly. Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods, Chapter 36, Listeria, p. 343-353, 1996.
6. Directrices sobre la Aplicación de Principios Generales de Higiene de los Alimentos para el Control de *Listeria monocytogenes* en los Alimentos. CAC/GL 61 – 2007.

DetECCIÓN de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos

(Procedimiento según USDA/FSIS: 2009)

1. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objeto describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar la detección, aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica para realizar la detección, aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos.

NOTA: Una vez identificado el microorganismo como *Listeria monocytogenes* por propiedades bioquímicas la cepa debe ser enviada al Centro de Referencia Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbrán”, para una mayor caracterización.

3. DESARROLLO

3.1. Medios de cultivo, reactivos, materiales y equipos

- 3.1.1. Caldo University of Vermont modificado (UVM)
- 3.1.2. Caldo Fraser (FB)
- 3.1.3. Agar Oxford modificado (MOX)
- 3.1.4. Agar sangre de caballo con una sobrecapa de agar (HL o HBO)
- 3.1.5. Agar tripticasa soja con 5% de sangre de oveja (TS-SBA)
- 3.1.6. Agar tripticasa soja - extracto de levadura (TSA-YE)
- 3.1.7. Caldo cerebro, corazón infusión (BHI)
- 3.1.8. Kit de pruebas bioquímicas capaz de identificar *Listeria monocytogenes* (ej. Galería API Listeria, bioMerieux, MICRO-ID, VITEK 2 Compact o equivalente)
- 3.1.9. Test de identificación genética: Kits de hibridación de DNA para *Listeria monocytogenes* (Gene Trak, GenProbe o equivalente)
- 3.1.10. Estufa de esterilización
- 3.1.11. Autoclave
- 3.1.12. Balanza electrónica capaz de pesar 25 g ± 0.1 g
- 3.1.13. Estufa de incubación a 30°C ± 2°C
- 3.1.14. Estufa de incubación a 35°C ± 2°C
- 3.1.15. Estufa de incubación a 20°C ó 25°C ± 2°C
- 3.1.16. Vórtex
- 3.1.17. Stomacher

- 3.1.18. Bolsas para stomacher con o sin filtro de capacidad adecuada.
- 3.1.19. Ansa de platino o níquel de aproximadamente 3 mm de diámetro ó 10 μ l.
- 3.1.20. Aguja de inoculación
- 3.1.21. Peachímetro calibrado con exactitud de 0.1 unidad de pH de 20°C a 25°C.
- 3.1.22. Pipetas graduadas o automáticas de 1 ml y de 100 μ l de capacidad nominal
- 3.1.23. Tubos o frascos de capacidad apropiada
- 3.1.24. Placas de Petri de vidrio o plástico.

3.2. Cultivos

- 3.2.1. Cepa de *Listeria monocytogenes* como control positivo: pueden ser ATCC 19111, NCTC 7973 u otro cultivo de *Listeria monocytogenes* validado
- 3.2.2. Cepa de *Listeria innocua* como control negativo: puede ser ATCC 33090 u otro cultivo de *Listeria innocua* validado
- 3.2.3. Otras cepas de *Listeria* spp. como *L. seeligeri*, *L. grayi* y *L. ivanovii* se pueden requerir como controles para pruebas confirmatorias adicionales.
- 3.2.4. Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ó ATCC 4944 y *Rhodococcus equi* ATCC 6939 para realizar el test de CAMP tradicional.

3.3. Procedimiento

3.3.1. Preparación de la muestra

Los envases intactos de las muestras deben ser desinfectados en el sitio de la incisión inmediatamente antes de realizar la misma para la toma de muestra. Para la desinfección se puede utilizar: peróxido de hidrógeno al 3 %, etanol al 70 %, o isopropanol al 70 %. Si el envase no parece estar limpio lavar antes de la desinfección con agua y jabón y luego enjuagar.

3.3.2. Primer enriquecimiento en caldo UVM

Pesar 25 g de la muestra en una bolsa de stomacher, agregar 225 ml de caldo UVM y homogeneizar durante 2 minutos \pm 0.2 minutos en Stomacher. Incubar durante 22 h \pm 2 h a 30°C \pm 2°C. Incluir un control positivo (ver 3.3.10) y un medio sin inocular como controles, por cada grupo de muestras analizadas.

3.3.3. Segundo enriquecimiento en caldo Fraser y siembra en placa directamente del caldo UVM

- 3.3.3.1. Transferir 0.1 ml \pm 0.02 ml del caldo UVM obtenido en 3.3.2. a 10 ml \pm 0.5 ml de caldo Fraser (FB) e incubar a 35 C^o \pm 2°C durante 26 h \pm 2 h.
- 3.3.3.2. Sembrar una ansada o una gota de aproximadamente 0.1 ml del caldo UVM obtenido en 3.3.2. sobre la superficie del agar MOX. Alternativamente con un hisopo estéril estriar el 25% - 50% de la superficie del agar MOX y con un

ansa estriar desde la zona hisopada el resto del agar para obtener colonias aisladas. Incubar a $35\text{ C}^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante $26\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

3.3.4. Observación de las placas de agar MOX sembradas directamente con caldo UVM y siembra del caldo Fraser en placas de agar MOX

3.3.4.1. Examinar las placas del punto 3.3.3.2. después de la incubación para la determinación de la presencia de colonias típicas de *Listeria* spp. Las colonias típicas son pequeñas (aproximadamente 1mm) y rodeadas por un halo de oscurecimiento debido a la hidrólisis de la esculina.

3.3.4.2. Seleccionar las colonias sospechosas y sembrarlas en agar HL, como se describe en el punto 3.3.6.1.

3.3.4.3. Si no se evidencian colonias sospechosas, reincubar las placas de agar MOX por $26\text{ h} \pm 2\text{ h}$ más.

3.3.4.4 Examinar después de la incubación los tubos con caldo Fraser para la visualización de un oscurecimiento del caldo debido a la hidrólisis de la esculina.

3.3.4.5. Si se evidencia oscurecimiento, sembrar asépticamente $0.1 \pm 0.02\text{ ml}$ de caldo Fraser en agar MOX. Estriar o hisopar el 25% - 40% de la superficie del agar y luego con un ansa estriar desde la zona hisopada el resto del agar para obtener colonias aisladas. Incubar a $35\text{ C}^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante $26\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

3.3.4.6. Si no se evidencia oscurecimiento, reincubar los tubos con caldo Fraser a $35^{\circ}\text{ C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante $26\text{ h} \pm 2\text{ h}$ más.

3.3.5. Observación de las placas de agar MOX y siembra del caldo Fraser de 48 h en placas de agar MOX

3.3.5.1. Examinar y seleccionar colonias sospechosas de cualquiera de las placas de agar MOX del análisis (ejemplo las placas de MOX estriadas desde el Caldo Fraser de $26\text{h} \pm 2\text{h}$ y/o UVM)

3.3.5.2. Re-examinar el caldo Fraser para evidenciar la presencia de oscurecimiento después de $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ de incubación.

3.3.5.3. Si se evidencia oscurecimiento, hisopar, estriar e incubar en placas de agar MOX.

3.3.5.4. Si no se evidencia oscurecimiento y no se observan colonias sospechosas en las placas de agar MOX o HL, la muestra se considera negativa para *Listeria monocytogenes*.

3.3.6. Aislamiento y purificación

3.3.6.1. Seleccionar las colonias sospechosas en las placas de agar MOX y con un ansa tocar como mínimo 20 colonias (si hay disponibles), y estriar por agotamiento en superficie en placas de agar HL para obtención de colonias aisladas. Incubar las placas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante $22\text{ h} \pm 4\text{ h}$.

3.3.6.2. Después de la incubación examinar las placas de agar HL a contra luz para observar colonias translúcidas rodeadas por un pequeño halo de β - hemólisis.

3.3.6.3. Si al menos una colonia sospechosa está claramente aislada, proceder con el test de confirmación (Conservar las placas a temperatura ambiente o en heladera hasta completar el test de confirmación).

3.3.6.4. Si hay colonias sospechosas con β - hemólisis pero no están aisladas, reaislar las colonias en un nuevo agar HL.

3.3.6.5. Si no se evidencian colonias sospechosas en ninguna de las placas de agar HL, la muestra se considera negativa para *Listeria monocytogenes*.

3.3.7. Confirmación y otros procedimientos de identificación

La identificación y confirmación de *Listeria monocytogenes* consiste en pruebas de confirmación preliminar, pruebas bioquímicas, test de CAMP y en algunas situaciones se requiere de tests genéticos.

3.3.7.1. Test de confirmación preliminar: a partir de una colonia aislada en agar HL inocular caldo BHI y, opcionalmente, inocular una placa fresca de agar HL para confirmar la pureza de la colonia. A partir de esa misma colonia inocular los medios para realizar las pruebas bioquímicas (agar HL, TSA-YE ó TS-SBA o equivalentes). Como mínimo una colonia debe ser confirmada.

Si la colonia sospechosa seleccionada en el agar HL no es confirmada como *L. monocytogenes*, se debe realizar la confirmación a otras colonias, si hay disponibles, hasta que al menos 3 colonias sospechosas den la confirmación negativa.

3.3.7.2. Prueba de la movilidad (opcional): inocular el caldo BHI, incubar de 16 h a 18 h a 18°C - 25°C. Si no se evidencia crecimiento, reincubar hasta que se observe crecimiento o hasta un máximo de 48 h. Luego de la incubación, depositar una gota del cultivo entre porta y cubre objeto bien limpio, y examinar en el microscopio. *Listeria spp.* aparece como bacilos cortos, delgados y con movimientos característicos de “tumbos” (tumbling).

3.3.7.3. Coloración de Gram: realizar la coloración de Gram. *Listeria spp.* se presenta como bacilos Gram positivos cortos y delgados.

3.3.7.4. Prueba de la catalasa: tomar una colonia aislada y suspender en una gota de solución de peróxido de hidrógeno en un portaobjeto. *Listeria spp.* da una reacción positiva que se evidencia por la formación inmediata de burbujas de gas.

NOTA: Si la morfología y la movilidad no es característica de *Listeria spp.* y el cultivo es puro, informar *Listeria monocytogenes* negativo

Si la morfología y la movilidad es característica de *Listeria spp.* y el cultivo es puro, continuar con las pruebas bioquímicas para la confirmación de *Listeria monocytogenes*.

3.3.7.5. Pruebas bioquímicas: a partir de colonias aisladas en agar HL, TSA-YE o TS-SBA o equivalentes, realizar la confirmación bioquímica mediante la galería de API Listeria – bioMérieux, MICRO-ID, VITEK 2 Compact o equivalente (siguiendo las instrucciones del fabricante) o mediante pruebas bioquímicas en tubo (ver Bacteriological Analytical Manual).

3.3.7.6. Prueba de CAMP (figura A)

3.3.7.6.1. En una placa de agar TS-SBA estriar en forma paralela una línea simple de *S. aureus* ATCC 25923 ó ATCC 4944 y otra línea simple de *Rhodococcus equi* ATCC 6939, separadas entre si 3-4 cm. Utilizar un ansa o aguja de inoculación.

3.3.7.6.2. Estriar los cultivos test en una línea simple y perpendicular, entre las dos líneas de cultivos de referencia. Las líneas de cultivo test deben estar separadas de las de referencia 2-4 mm. Durante el estriado, las líneas test y referencia no se deben tocar para evitar contaminación cruzada.

3.3.7.6.3. Simultáneamente estriar cultivos controles de *L.monocytogenes*, *L. innocua* y *L. ivanovii*

3.3.7.6.4. Incubar 24 h \pm 2 h a 35°C

3.3.7.6.5. Se considera reacción positiva una zona acrecentada de β -hemólisis en la intersección de los cultivos test y los cultivos de *S.aureus* y *R.equi*.

3.3.7.6.6. Una reacción positiva para *R. equi* se ve como una amplia zona (5 a 10 mm) en forma de “cabeza de flecha” de hemólisis. La reacción es negativa si se presenta como una pequeña zona (alrededor de 1 mm) de hemólisis débil en la intersección del cultivo test con la zona de difusión de *R.equi*.

3.3.7.6.7. Una reacción positiva para *S.aureus* se ve como una pequeña zona de hemólisis acrecentada, que se extiende alrededor de 3 a 4 mm del cultivo test y dentro de la zona de hemólisis débil debida al crecimiento del cultivo de *S.aureus*. No ocurre una zona grande de β - hemólisis en la proximidad de las áreas entre *S.aureus* y *L. monocytogenes*.

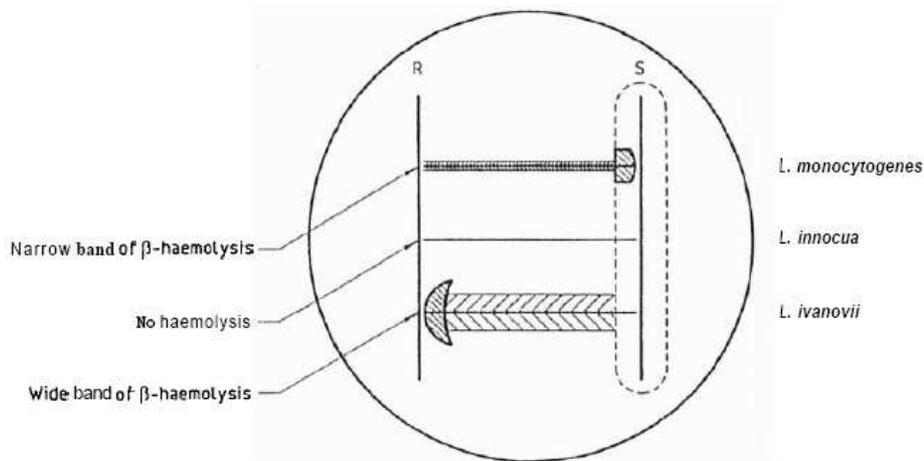


Figura A: Prueba de Camp

3.3.8. Interpretación bioquímica

Especie	Hemólisis	Producción de ácido		Test de CAMP	
		ramnosa	xilosa	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. grayi sub. grayi</i>	-	-	-	-	-
<i>L. grayi sub. murrayi</i>	-	V	-	-	-

V: reacción variable

(+): reacción positiva débil

+: > del 90 % reacciones positivas

-: reacción negativa

Nota: existen algunas cepas raras de *L. monocytogenes* que no dan β -hemólisis y dan reacción de CAMP negativa.

3.3.9. Test de identificación genética

Los tests de identificación genética pueden ser utilizados como tests confirmatorios para todas las cepas de *Listeria monocytogenes* identificadas por pruebas bioquímicas. Sin embargo, pueden ser requeridos para identificar cepas atípicas sospechosas de ser *L. monocytogenes*. En algunos casos no se pueden diferenciar las cepas de *L. monocytogenes* de las cepas de *L. innocua* por pruebas fenotípicas, en particular para *L. monocytogenes* β - hemolíticas rramnosa negativa y fosfolipasa C negativa. En otros casos, una *L. monocytogenes* débilmente hemolítica puede ser confundida como *L. innocua* (además existen las cepas de *L. innocua* β -hemolíticas).

3.3.10. Expresión de los resultados

De acuerdo a los resultados de 3.3.8. y 3.3.9 (en caso de realizarse) indicar presencia o ausencia de *Listeria monocytogenes* en la cantidad de muestra analizada (por gramos o mililitros para muestras líquidas).

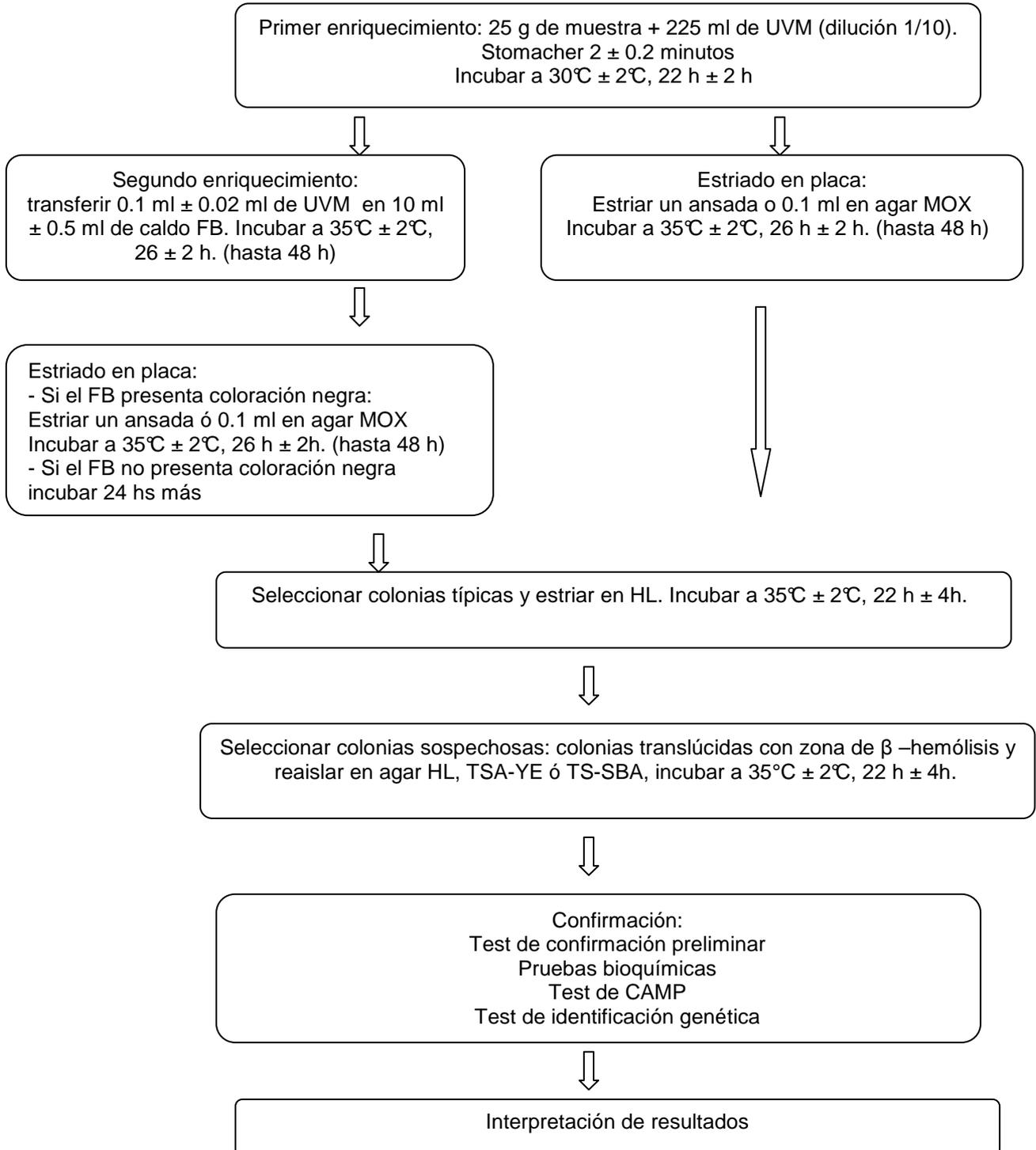
Nota: Una vez identificado el microorganismo como *Listeria monocytogenes* por propiedades bioquímicas, la cepa debe ser enviada al Centro de Referencia Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbrán”, para una mayor caracterización.

3.3.11. Control positivo

Junto con la muestra realizar un control positivo con un inóculo de una cepa de *Listeria monocytogenes* de referencia, y proceder de la misma manera que la muestra para demostrar que el cultivo positivo es recuperado.

4. ANEXOS

ANEXO 1: Diagrama de flujo del procedimiento para la detección de *Listeria monocytogenes*



ANEXO 2: Medios de cultivos y reactivos

1. Caldo University of Vermont modificado (UVM)

Proteasa Peptona	5.0 g
Triptona	5.0 g
Lamb Lemco powder (o extracto de carne)	5.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	20.0 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH ₂ PO ₄)	1.35 g
Disodio hidrógeno fosfato (Na ₂ HPO ₄)	12.0 g
Esculina	1.0 g
Acido nalidíxico (2 % en NaOH 0.1 M)	1.0 ml
Acriflavina	12.0 mg
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 7.2 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. NO SOBRECALENTAR. Enfriar después de esterilizar. Si el medio se oscurece o ennegrece, fue sometido a sobrecalentamiento y debe ser descartado.

2. Caldo Fraser (FB)

Proteasa Peptona	5.0 g
Triptona	5.0 g
Lamb Lemco powder (o extracto de carne)	5.0g
Extracto de levadura	5.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	20.0 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH ₂ PO ₄)	1.35 g
Disodio hidrógeno fosfato (Na ₂ HPO ₄)	12.0 g
Esculina	1.0 g
Acido nalidíxico (2 % en NaOH 0.1 M)	1.0 ml
Cloruro de litio	3.0 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada y fraccionar en tubos en porciones de 10 ml. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor después de la esterilización de 7.2 ± 0.2 a 25°C. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. NO SOBRECALENTAR. Enfriar después de esterilizar. Si el medio se oscurece o ennegrece, fue sometido a sobrecalentamiento y debe ser descartado. Guardar en refrigeración. Inmediatamente antes del uso agregar a los 10 ml de Caldo Fraser 0.1 ml de la solución de acriflavina (2.5 mg/ml esterilizada por filtración) y 0.1 ml de la solución de citrato amoniacal férrico al 5 % esterilizada por filtración.

3. Agar Oxford Modificado (MOX)

3.1 Medio base

Polipeptona	20.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Almidón	1.0 g
Cloruro de Sodio (NaCl)	5.0 g
Esculina	1.0 g
Citrato férrico amoniacal	0.5 g
Cloruro de litio	15.0 g
Agar bacteriológico	13.0 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada llevando a ebullición con constante agitación, hasta completa disolución. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 7.0 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Fraccionar 100 ml en frascos y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar y mantener el medio a 47°C y, asépticamente, agregar a los 100 ml del medio base 1 ml del suplemento selectivo Oxford (instrucciones para el suplemento selectivo Oxford CCCFA de Biokar Diagnostics) siguiendo las indicaciones del fabricante.

4. Agar sangre de caballo con una sobrecapa de agar (HL ó HBO)

4.1 Capa de base

Agar base Columbia: preparar de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Volcar 10 ml en una placa de Petri de 100 mm, dejar solidificar y hacer la sobrecapa con el agar sangre descrito en 4.2.

4.2 Sobrecapa

Agregar un 4 % de sangre de caballo estéril al agar base Columbia fundido y enfriado a 46°C, mezclar bien y rápidamente agregar de 5 a 6 ml arriba de la capa de agar base realizada en 4.1 y mover para distribuir bien la sobrecapa. Almacenar en heladera hasta 2 semanas.

5. Agar Trypticasa soja con 5% de sangre de oveja (TS-SBA)

Trypticasa (Tryptic- digestivo pancreático de caseína)	15.0 g
Phytone (digesto papaínico de harina de poroto de soja)	5.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Agar	15.0 g
Agua	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada calentando con constante agitación hasta completa disolución. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de $7.3 \pm 0,2$ a 25°C después de la esterilización. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 50°C aproximadamente, agregar un 5 % de sangre de oveja desfibrinada y mezclar bien. Evitar formación de burbujas. Volcar 15 ml en placas de Petri de 100 mm y dejar solidificar.

6. Agar Trypticosa soja- extracto de levadura (TSA-YE)

Trypticosa (Tryptic)	15.0 g
Phytone (digesto papaínico de harina de poroto de soja)	5.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Extracto de levadura	6.0 g
Agar	15.0 g
Agua	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada, calentando con constante agitación hasta completa disolución. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de $7.3 \pm 0,2$ a 25°C después de la esterilización. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a $45^{\circ}\text{C} - 50^{\circ}\text{C}$ y volcar en placas de Petri.

7. Caldo cerebro, corazón infusión (BHI)

Digestivo pancreático de gelatina	14.5 g
Sólidos de cerebro, corazón	6.0 g
Digestivo peptico de tejido animal	6.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Glucosa	3.0 g
Disodio hidrógeno fosfato (Na_2HPO_4)	2.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 7.4 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Fraccionar en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

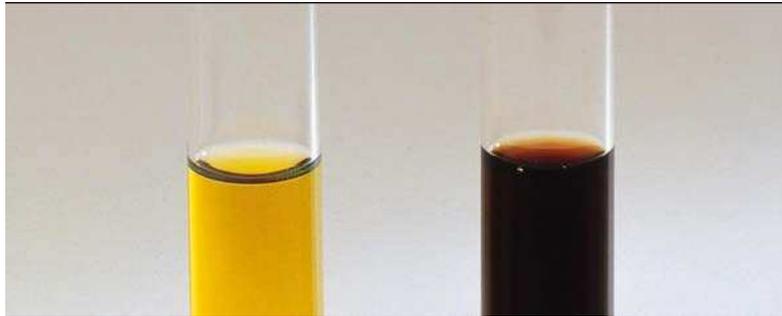
8. Agar movilidad

Digesto enzimático de caseína	20.0 g
Digesto enzimático de tejido animal	6.1 g
Agar	3.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada, calentando a ebullición hasta completa disolución. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 7.3 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Fraccionar en tubos en cantidad de 5 ml aproximadamente. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

ANEXO 3: Fotos

1. Caldo Fraser



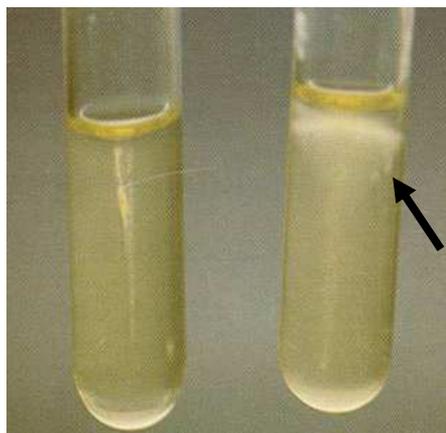
Izquierda: control negativo
Derecha: control positivo

2. Agar Oxford Modificado



Listeria monocytogenes: colonias típicas pequeñas (aproximadamente 1mm) y rodeadas por un halo de oscurecimiento.

3. Test de movilidad



Listeria monocytogenes: crecimiento en forma de paraguas (foto derecha)

5. REFERENCIAS

- 5.1. USDA. MLG 8.07. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg and Enviromental Samples. Effective Date: 8/3/03.

DetECCIÓN de *Listeria monocytogenes* en muestras de alimentos

(Procedimiento según FDA-BAM: 2011)

1. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objeto describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar la detección, aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* en alimentos.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica para realizar la detección, aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* en alimentos.

NOTA: Una vez identificado el microorganismo como *Listeria monocytogenes* por propiedades bioquímicas la cepa debe ser enviada al Centro de Referencia Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbrán”, para una mayor caracterización.

3. DESARROLLO

3.1. Medios de cultivo, reactivos, materiales y equipos

- 3.1.1. Acido acético 5 N
- 3.1.2. Clorhidrato de acriflavina
- 3.1.3. Agar
- 3.1.4. N-(1- naftil) etilen diamina
- 3.1.5. Agar base sangre
- 3.1.6. Cicloheximida
- 3.1.7. Natamicina
- 3.1.8. Sangre de oveja desfibrinada
- 3.1.9. Etanol absoluto
- 3.1.10. Kit para coloración de Gram
- 3.1.11. Solución de peróxido de hidrogeno al 3 % (para la prueba de catalasa)
- 3.1.12. Agar cloruro de litio-feniletanol-moxalactam (LPM) con agregado de hierro y esculina.
- 3.1.13. Sal sódica de ácido nalidíxico
- 3.1.14. Medio y reactivos para la prueba de reducción de nitrato
- 3.1.15. Caldo nutritivo
- 3.1.16. Solución salina fisiológica al 0.85 %
- 3.1.17. Caldo base púrpura de bromocresol para fermentación de carbohidratos con 0.5% de soluciones de dextrosa, esculina, maltosa, ramnosa, manitol y xilosa.

- 3.1.18. Agar SIM o medio para la prueba de movilidad (MTM)
- 3.1.19. Agar tripticasa soja con 0.6 % de extracto de levadura (TSA-YE)
- 3.1.20. Caldo tripticasa soja con 0.6 % de extracto de levadura (TSB-YE)
- 3.1.21. Agar Oxford (OXA)
- 3.1.22. Caldo de enriquecimiento buffer Listeria (BLEB)
- 3.1.23. Agar PALCAM
- 3.1.24. Agar BCM
- 3.1.25. Agar Oxford Modificado (MOX)
- 3.1.26. Agar ALOA
- 3.1.27. Agar Cromogénico para Listeria
- 3.1.28. CHROMagar Listeria
- 3.1.29. Estufa de esterilización
- 3.1.30. Autoclave
- 3.1.31. Balanza electrónica capaz de pesar 25 ± 0.1 g
- 3.1.32. Estufa de incubación a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 3.1.33. Estufa de incubación a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 3.1.34. Vórtex
- 3.1.35. Stomacher
- 3.1.36. Bolsas para stomacher con o sin filtro de capacidad adecuada.
- 3.1.37. Ansa de platino o níquel de aproximadamente 3 mm de diámetro ó 10 μl .
- 3.1.38. Aguja de inoculación
- 3.1.39. Peachímetro calibrado con exactitud de 0.1 unidad de pH de 20°C a 25°C .
- 3.1.40. Pipetas graduadas o automáticas de 25 ml, 10 ml y 1 ml de capacidad nominal
- 3.1.41. Tubos o frascos de capacidad apropiada
- 3.1.42. Placa de Petri de vidrio o plástico.
- 3.1.43. Kit de pruebas bioquímicas capaz de identificar *Listeria monocytogenes* (ej. Galería API Listeria, bioMerieux, MICRO-ID, VITEK 2 Compact o equivalente)
- 3.1.44. Test de tamizaje (screening) para determinación de *Listeria* spp. (ejemplo GENE-TRAK, TECRA, VIDAS o equivalente)
- 3.1.45. Sueros para tipificación de *Listeria*

3.2. Cultivos

- 3.2.1. Cepa de *Listeria monocytogenes* como control positivo: pueden ser ATCC 19111, NCTC 7973 u otro cultivo de *Listeria monocytogenes* validado
- 3.2.2. Cepa de *Listeria innocua* como control negativo: puede ser ATCC 33090 u otro cultivo de *Listeria innocua* validado
- 3.2.3. Otras cepas de *Listeria* spp. como *L. seeligeri*, *L. grayi* y *L. ivanovii* se pueden ser requerir como controles para pruebas confirmatorias adicionales.
- 3.2.4. Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ó ATCC 4944 y *Rhodococcus equi* ATCC 6939 para realizar el test de CAMP tradicional.

3.3. Procedimiento

3.3.1. Preparación de la muestra

Los envases intactos de las muestras deben ser desinfectados en el sitio de la incisión inmediatamente antes de realizar la misma para la toma de muestra. Para la desinfección se puede utilizar: peróxido de hidrógeno al 3 %, etanol al 70 %, o isopropanol al 70 %. Si el envase no parece estar limpio, lavar antes de la desinfección con agua y jabón y luego enjuagar.

3.3.2. Preenriquecimiento y enriquecimiento

Pesar 25 g de la muestra en una bolsa de Stomacher, agregar 225 ml de BLEB y homogeneizar. Incubar durante 4 h a 30°C. Agregar los agentes selectivos y continuar la incubación por 24 h- 48 h.

NOTA: La cicloheximida puede ser reemplazada por natamicina (25 mg/l).

En el caso de matrices con bajos recuentos de mohos (como ser leche y crema pasteurizada, yogurt, etc.) no agregar los agentes antifúngicos.

3.3.3. Test de screening (OPCIONAL)

Del caldo de enriquecimiento, realizar el test de screening siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3.4. Aislamiento

3.3.4.1. A partir del caldo de enriquecimiento BLEB de 24 h y 48 h de incubación, estriar en uno de los siguientes agares selectivos para aislamiento: OXA, PALCAM, MOX, LPM. Incubar las placas de OXA, MOX, PALCAM a 35°C durante 24 h – 48 h, y las placas de LPM a 30° C durante 24 h – 48 h.

3.3.4.2. A partir del caldo de enriquecimiento de 48 h (y del caldo de 24 h en forma opcional) estriar en uno de los siguientes medios selectivos diferenciales: BCM, ALOA o CHROMagar.

NOTA: el paso 3.3.4.2 es recomendado para reducir el problema de confundir *L. monocytogenes* con *L.innocua*.

3.3.5. Selección de colonias sospechosas

3.3.5.1. Examinar las placas del punto 3.3.4.1 después de la incubación, para la determinación de la presencia de colonias típicas de *Listeria* spp.. Las colonias típicas son pequeñas (aproximadamente 1mm) y rodeadas por un halo de oscurecimiento debido a la hidrólisis de la esulina.

Seleccionar 5 ó más colonias típicas y sembrar por estriado en agar TSA-YE para aislamiento de las colonias sospechosas. Incubar a 30°C durante 24 h – 48 h.

3.3.5.2. Examinar las placas del punto 3.3.4.2 después de la incubación para la determinación de la presencia de colonias típicas de *Listeria monocytogenes*, que se evidencian de la siguiente manera:

- Agar BCM: colonias azules
- Agar ALOA: las colonias de *L.monocytogenes* y *L. ivanovii* son azules con una zona de lipólisis.

Seleccionar 5 ó más colonias típicas y sembrar por estriado en agar TSA-YE, para aislamiento de las colonias sospechosas. Incubar a 30°C durante 24 h – 48 h.

NOTA: El TSA-YE se puede incubar a 35°C si las colonias no se someterán al test de movilidad (3.3.6.2).

3.3.6. Identificación

3.3.6.1. Observación de colonias típicas con el sistema óptico de Henry (opcional)

Examinar las placas de TSA-YE para ver las colonias típicas. En forma opcional se pueden examinar las colonias con el sistema óptico de Henry (fig. 1), el cual consta de un rayo de luz blanca, transmitido en forma oblicua y lo suficientemente intenso como para iluminar bien la placa en un ángulo de 45°. Las colonias se observan con una coloración azul grisácea a azul. Se recomienda el uso de controles positivos y negativos. La placa se puede observar a simple vista, pero se recomienda utilizar un microscopio de baja resolución o un microscopio de disección (con espejo incorporado).

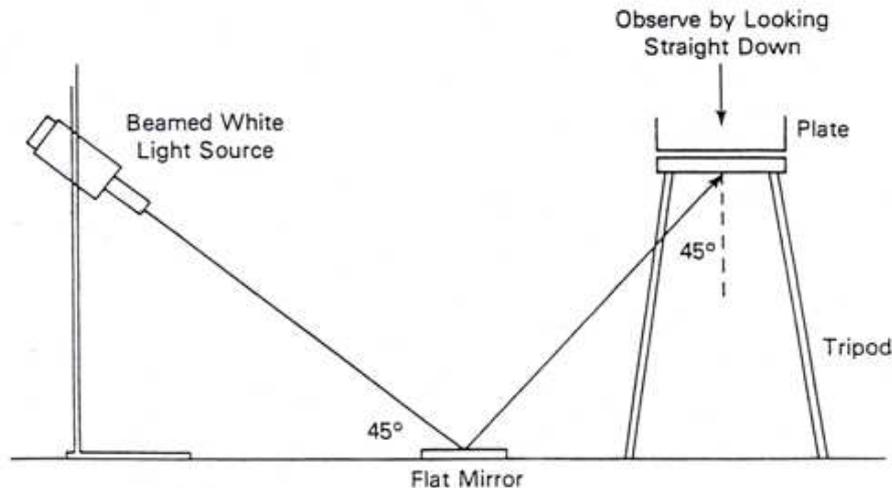


Figura 1: Sistema óptico de Henry

3.3.6.2. Prueba de la movilidad

A partir de una colonia típica de una placa incubada a una temperatura de 30°C o menor, preparar una suspensión densa en solución fisiológica al 0.85 %. Depositar una gota de la suspensión entre porta y cubreobjeto bien limpios y examinar en el microscopio. *Listeria* spp. se presenta como bacilos cortos, delgados y con movimientos característicos en tumbos (tumbling).

3.3.6.3. Prueba de la catalasa

Tomar una colonia aislada y suspender en una gota de solución de peróxido de hidrógeno al 3 % en un portaobjeto. Una reacción positiva se ve por la formación inmediata de burbujas de gas.

3.3.6.4. Coloración de Gram

Realizar la coloración de Gram. *Listeria* spp. se presenta como bacilos Gram positivos cortos y delgados.

3.3.6.5. Inoculación en caldo TSB-YE

Inocular las colonias típicas en un tubo con caldo TSB-YE. Incubar a 35°C durante 24 h. Este cultivo puede ser conservado a 4°C durante varios días para repetidas inoculaciones. A partir de este tubo se realizarán las pruebas de fermentación de hidratos de carbono y otras pruebas bioquímicas.

3.3.6.6. Prueba de hemólisis

A partir del agar TSA-YE inocular el agar sangre de oveja al 5 %, para realizar el test de hemólisis.

Secar bien la superficie del agar sangre de oveja antes de usar, delinear una grilla de 20 - 25 espacios en la base de la placa y, a partir de una colonia aislada, sembrar con aguja. Utilizar un espacio para cada cultivo.

Simultáneamente sembrar controles positivos (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*) y un control negativo (*L. innocua*).

Incubar a 35°C durante 24 h – 48 h.

Después de la incubación, examinar las cepas bajo luz brillante:

- *L. monocytogenes*: produce una delgada y clara zona de β -hemólisis
- *L. innocua*: no produce zona de hemólisis
- *L. seeligeri*: produce una zona de hemólisis débil
- *L. ivanovii*: generalmente produce una amplia y clara zona de β -hemólisis

NOTA: No diferenciar especies en este punto, pero registrar la naturaleza de la reacción de hemólisis. En caso de reacciones dudosas, resolver con el test de CAMP.

La prueba de hemólisis se observa mejor cuando se utiliza una capa de agar sangre más delgada de lo usual. También se puede utilizar una sobrecapa de agar sangre de 1- 2 mm de grosor.

3.3.6.7. Reducción de nitrato (opcional)

Sólo *Listeria grayi* ssp. *murrayi* reduce nitratos. Este test permite distinguir *L. grayi* ssp. *murrayi* de *L. grayi* ssp. *grayi*.

A partir del caldo TSB-YE (3.3.6.5) inocular el caldo nitrato. Incubar a 35°C durante 5 días. Agregar 0.2 ml del reactivo A, seguido de 0.2 ml del reactivo B. El desarrollo de una coloración rojo - violeta indica la presencia de nitritos (reducción del nitrato). Si no hay desarrollo de color, agregar zinc en polvo y

esperar 1 h. El desarrollo de coloración rojo - violeta indica que no hubo reducción de nitratos.

3.3.6.8. Inoculación en SIM o MTM

A partir del caldo TSB-YE inocular agar SIM ó MTM, incubar a temperatura ambiente 7 días. Observar diariamente. *Listeria* spp. es móvil y da un crecimiento típico en forma de paraguas (umbrella) en la cercanía de la superficie del agar.

En el medio MTM se observa un crecimiento típico más definido.

3.3.6.9. Prueba de fermentación de carbohidratos

A partir del cultivo obtenido en TS-YEB inocular con un ansa cada uno de los caldos para utilización de carbohidratos (caldo base púrpura de bromo cresol para fermentación de carbohidratos con 0.5 % de soluciones de dextrosa, esculina, maltosa, ramnosa, manitol y xilosa). El uso de campanita de Durham es opcional.

Incubar a 35°C hasta 7 días. Una reacción positiva (formación de ácido) se visualiza por una coloración amarilla, que generalmente sucede dentro de las 24 h ó 48 h.

Todas las especies de *Listeria* son positivas para dextrosa, esculina y maltosa y negativas para manitol (excepto *L. grayi*).

Ver punto 3.3.7 para interpretación de resultados.

NOTA: si la reacción de esculina se evidencia bien en los medios OXA, PALCAM, MOX, LPM se puede omitir esta prueba en tubo.

3.3.6.10. Pruebas bioquímicas por kits comerciales

Los cultivos puros pueden ser identificados por sistemas de identificación bioquímica disponibles en el comercio (ej. API *Listeria*, Vitek, MICRO-ID-bioMérieux)

3.3.6.11. Prueba de CAMP (figura A)

- En una placa de agar sangre de oveja estriar en forma paralela una línea simple de *S. aureus* ATCC 25923 ó ATCC 4944 y otra línea simple de *Rhodococcus equi* ATCC 6939, separadas entre sí 3-4 cm. Utilizar un ansa o aguja de inoculación.

- Estriar los cultivos test en una línea simple y perpendicular entre las dos líneas de cultivos de referencia. Las líneas de cultivo test deben estar separadas de las de referencia 2 - 4 mm. Durante el estriado las líneas test y referencia no se deben tocar para evitar contaminación cruzada.

- Simultáneamente estriar cultivos controles de *L.monocytogenes*, *L. innocua* y *L. ivanovii*

- Incubar 24 h a 48 h a 35°C.

- Se considera reacción positiva una zona acrecentada de β -hemólisis en la intersección de los cultivos test y los cultivos de *S.aureus* y *R.equi*.

- Una reacción positiva para *R. equi* se ve como una amplia zona (5 a 10 mm) en forma de "cabeza de flecha" de hemólisis. La reacción es negativa si se

presenta como una pequeña zona (alrededor de 1 mm) de hemólisis débil en la intersección del cultivo test con la zona de difusión de *R. equi*.

- Una reacción positiva para *S. aureus* se ve como una pequeña zona de hemólisis acrecentada, que se extiende alrededor de 3 a 4 mm del cultivo test y dentro de la zona de hemólisis débil debida al crecimiento del cultivo de *S. aureus*. No ocurre una zona grande de β -hemólisis en la proximidad de las áreas entre *S. aureus* y *L. monocytogenes*.

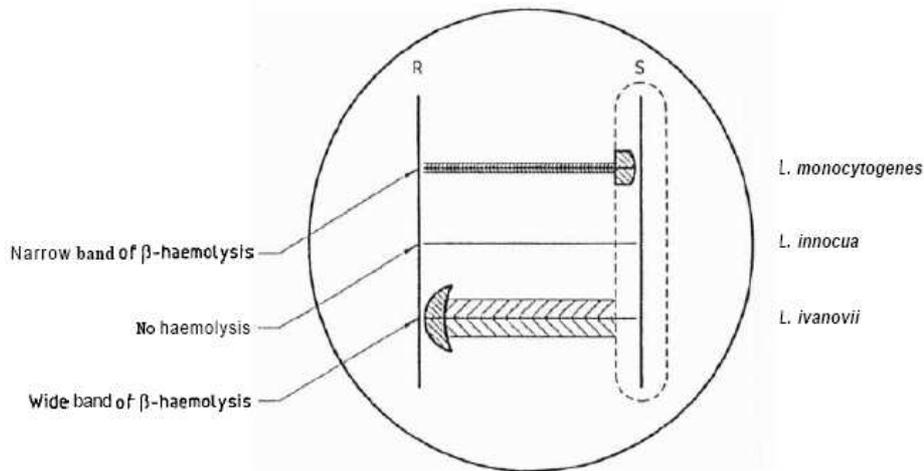


Figura A: Prueba de Camp

3.3.7. Interpretación de propiedades morfológicas, fisiológicas y reacciones bioquímicas

Todas las especies de *Listeria* spp. son bacilos cortos Gram positivos móviles, catalasa positivos.

Listeria monocytogenes se distingue de las demás especies por las propiedades presentadas en la siguiente tabla.

Especie	Hemólisis	Producción de ácido			Test de CAMP	
		manitol	ramnosa	xilosa	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	V	+	-	-
<i>L. grayi sub. grayi</i>	-	+	-	-	-	-
<i>L. grayi sub. murrayi</i>	-	+	V	-	-	-

V: reacción variable

(+): reacción positiva débil

+: > del 90 % reacciones positivas
-: reacción negativa

NOTA: existen algunas cepas raras de *L. monocytogenes* que no dan β – hemólisis y dan reacción de CAMP negativa.

3.3.8. Test de identificación genética

Los tests de identificación genética pueden ser utilizados como tests confirmatorios para todas las cepas de *Listeria monocytogenes* identificadas por pruebas bioquímicas. Sin embargo, pueden ser requeridos para identificar cepas atípicas sospechosas de ser *L. monocytogenes*. En algunos casos no se pueden diferenciar las cepas de *L. monocytogenes* de las cepas de *L. innocua* por pruebas fenotípicas, en particular para *L. monocytogenes* β -hemolíticas raramente negativa y fosfolipasa C negativa. En otros casos una *L. monocytogenes* débilmente hemolítica puede ser confundida como *L. innocua* (además existen las cepas de *L. innocua* β -hemolíticas).

3.3.9. Serotipificación

Para la serotipificación se pueden utilizar sueros comerciales para caracterizar a los aislamientos como tipo 1, tipo 4 ó no tipo 1 ó 4 (tipo 3, 5, 6 etc.). Seguir las instrucciones del fabricante.

Especies de <i>Listeria</i>	serotipos
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, "7"
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. innocua</i>	4ab, 6a, 6b, IN ^a
<i>L. welshimeri</i>	6a,6b
<i>L. seeligeri</i>	1/2b, 4c, 4d, 6b, IN ^a

a: IN: indefinido

La mayoría de los aislamientos de *L. monocytogenes* obtenidos en pacientes y en muestras ambientales corresponden a los serotipos 1 y 4. Más del 90 % de los aislamientos de *L. monocytogenes* pueden ser serotipificados con sueros disponibles en el comercio. Todas las especies no patogénicas excepto *L. welshimeri* comparten uno o más antígenos somáticos con *L. monocytogenes*.

3.3.10. Expresión de los resultados

De acuerdo a la interpretación de resultados, indicar presencia o ausencia de *Listeria monocytogenes* en la cantidad de muestra analizada (por gramos o mililitros para muestras líquidas).

Nota: Una vez identificado el microorganismo como *Listeria monocytogenes* por propiedades bioquímicas, la cepa debe ser enviada al Centro de Referencia

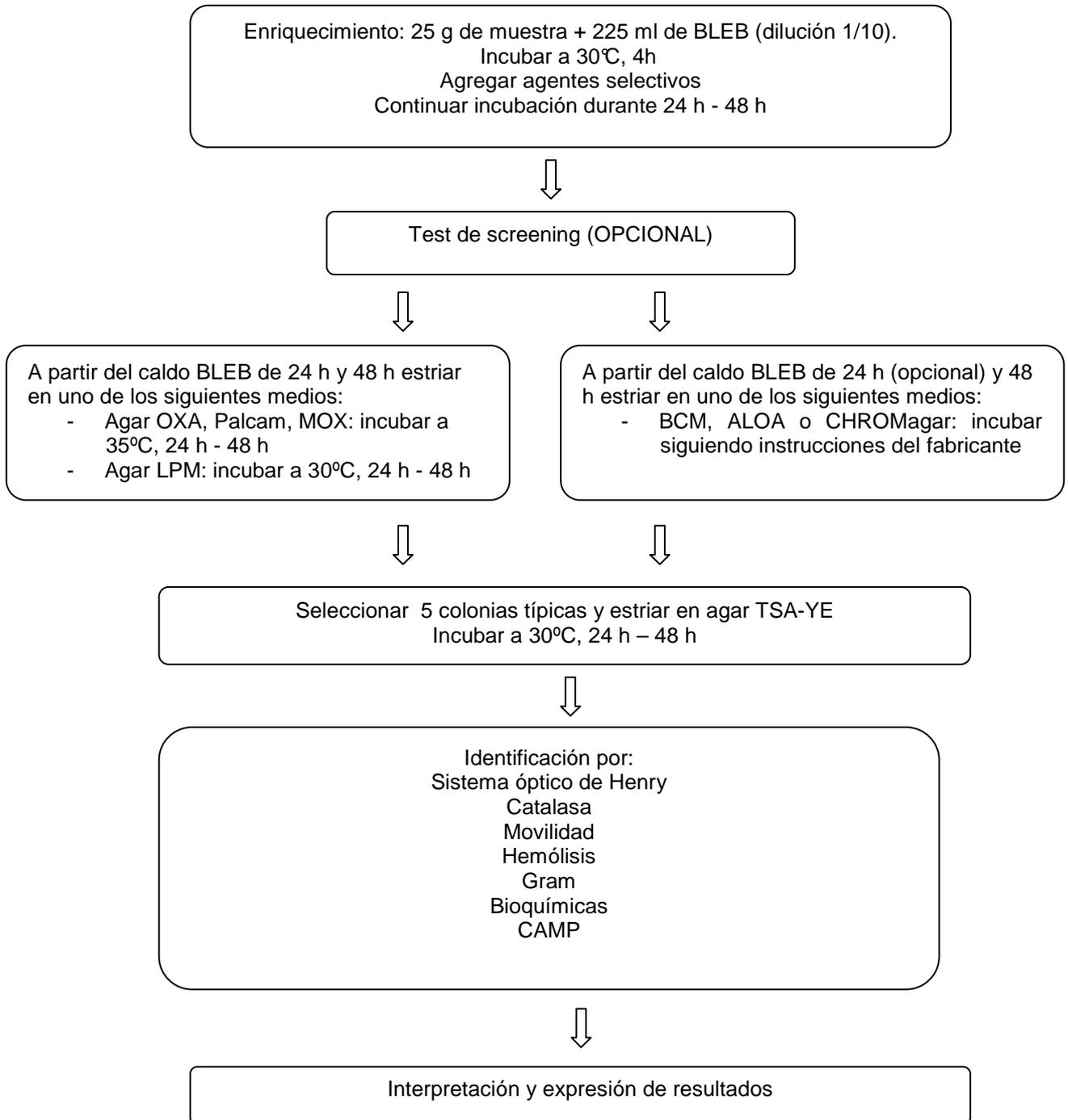
Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbrán”, para una mayor caracterización.

3.3.11. Control positivo

Junto con la muestra, realizar un control positivo con un inóculo de una cepa de *Listeria monocytogenes* de referencia, y proceder de la misma manera que la muestra para demostrar que el cultivo positivo es recuperado.

4. ANEXOS

ANEXO 1: Diagrama de flujo del procedimiento para la detección de *Listeria monocytogenes*



ANEXO 2: Medios de cultivos y reactivos

1. Caldo de enriquecimiento buffer Listeria (BELB)

Caldo TSB – YE suplementado con :	
Potasio dihidrógeno fosfato anhidro (KH ₂ PO ₄)	1.35 g / l
Disodio hidrógeno fosfato (Na ₂ HPO ₄)	9.6 g / l
Clorhidrato de acriflavina HCl	10.0 mg / l
Acido nalidíxico (sal sódica)	40.0 mg / l
Cicloheximida	50.0 mg / l
Acido pirúvico (sal sódica, 10% P/V en solución acuosa)	11.1 ml / l

Esterilizar el medio base (caldo TSB-YE) sin el agregado de los 3 agentes selectivos a 121°C durante 15 minutos.

Agregar 2.5 ml de una solución al 10 % (p/v) de piruvato de sodio (previamente esterilizada por filtración)

Nota: el piruvato de sodio puede ser agregado antes del autoclavado.

Preparar la acriflavina y el ácido nalidíxico como una solución stock al 0.5 % (p/v) en agua destilada,

Preparar el suplemento cicloheximida como una solución stock al 10 % (p/v) en una solución al 40 % (v/v) de etanol en agua.

Esterilizar los 3 agentes selectivos por filtración.

Agregar asépticamente las siguientes cantidades de solución stock de los 3 agentes selectivos a 225 ml del caldo de enriquecimiento que contiene la muestra después de 4 h de incubación a 30 °C: 0.455 ml de acriflavina, 1.8 ml de ácido nalidíxico y 1.15 ml de cicloheximida

2. Agar tripticasa soja con extracto de levadura (TSA-YE) al 0.6 %

2.1 Agar tripticasa soja (TSA)

Tripticasa peptona	15.0 g
Fitopeptona	5.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Agar	15.0 g

2.2 Agar tripticasa soja con extracto de levadura (TSA-YE) al 0.6 %

Agar Tripticasa soja (TSA)	40.0 g
Extracto de levadura	6.0 g
Agua	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada, calentando si es necesario. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor de 7.3 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Enfriar el medio entre 44°C a 47°C, y verter 15 ml en una placa de Petri. Dejar solidificar.

3. Caldo tripticasa soja con extracto de levadura al 0.6 % (TSB-YE)

3.1 Caldo tripticasa soja (TSB)

Tripticasa peptona	17.0 g
Fitopeptona	3.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Potasio dihidrógeno fosfato anhidro (KH ₂ PO ₄)	2.5 g
Glucosa	2.5 g
Agua destilada	1000 ml

Caldo Tripticasa soja	30.0 g
Extracto de levadura	6.0 g
Agua	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada, calentando si es necesario. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 7.3 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

4. Agar Oxford

Agar base Columbia sangre	39.0 g
Esculina	1.0 g
Citrato férrico amoniacal	0.5 g
Cloruro de litio	15.0 g
Cicloheximida	0.4 g
Sulfato de colistina	0.02 g
Acriflavina	0.005 g
Cefotetan	0.002 g
Fosfomicina	0.010 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los primeros cuatro componentes (55.5 g) en 1 litro de agua destilada. Mezclar suavemente, calentando hasta completa disolución. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 50° C y agregar asépticamente los suplementos. Mezclar, y volcar en placas de Petri.

Para preparar el suplemento disolver la cicloheximida, el sulfato de colistin, la acriflavina, el cefotetan y la fosfomicina en 10 ml de una mezcla 1:1 de agua destilada y etanol, y esterilizar por filtración.

5. Agar Oxford Modificado (MOX)

Agar base Columbia sangre	39.0 a 44.0 g
Agar	2.0 g
Esculina	1.0 g
Citrato férrico amoniacal	0.5 g
Cloruro de litio	15.0 g
Solución bufferada de sulfonato de metano colistina	1.0 ml
Agua destilada	1000 ml

Disolver el medio basal en agua destilada, ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 7.2 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Esterilizar a 121°C durante 10 minutos. Mezclar, enfriar a 46°C y agregar 2 ml de una solución bufferada de moxalactam al 1 % (p/v), esterilizada por filtración. Mezclar bien y volcar 12 ml por cada placa de Petri.

5.1 Solución bufferada de colistina al 1 % (p/v)

Sulfonato de metano colistin (Sigma C1511 o equivalente)	1.0 g
Buffer fosfato de potasio, 0.1 M, pH 6.0 ± 0.1	100 ml

Fraccionar en alícuotas de 5 ml y conservar a -20°C .

5.2 Solución bufferada de moxalactam al 1 % (p/v)

Moxalactam sodio (o amonio) (Sigma M1900 o equivalente)	1.0 g
Buffer fosfato de potasio, 0.1 M, pH 6.0 ± 0.1	100 ml

Disolver, esterilizar por filtración y fraccionar en alícuotas de 2 ml. Conservar a -20°C

6. Agar Palcam

6.1. Medio basal

Peptona	23.0 g
Almidón	1.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Agar base Columbia	13.0 g
Manitol	10.0 g
Citrato férrico amoniacal	0.5 g
Esculina	0.8 g
Glucosa	0.5 g
Cloruro de litio	15.0 g
Rojo fenol	0.08 g
Agua destilada	1000 ml

6.2 Agentes selectivos

Sulfato de polimixina B	10.0 mg
Acriflavina	5.0 mg
Ceftazidina	20.0 mg
Agua destilada	2.0 ml

Para preparar 500 ml de medio, pesar 34.4 g del medio basal (todos los ingredientes excepto los 3 agentes selectivos) y disolver en 500 ml de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Disolver la mezcla de agentes selectivos en agua destilada (17.5 g en 1 ml) y esterilizar por filtración.

Agregar 1 ml de la mezcla de agentes selectivos a 500 ml del medio base esterilizado y enfriado a 50°C. Mezclar y volcar en placas de Petri. Ajustar el pH final a 7.2 ± 0.1 .

7. Agar cloruro de litio-feniletanol-moxalactam (LPM) con agregado de hierro y esculina

7.1 Medio base

Agar feniletanol (Difco)	35.5 g
Glicina anhidra	10.0 g
Cloruro de litio	5.0 g
Solución stock de moxalactam (1% en buffer fosfato, pH 6.0)	2.0 ml
Agua destilada	1000 ml

Esterilizar el medio sin el moxalactam en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 48°C - 50°C. Agregar 2 ml de la solución de moxalactam, la esculina y el citrato férrico amoniacal.

Solución stock de moxalactam: disolver 1 g de sal de moxalactam (sal de amonio o sodio) en 100 ml de buffer fosfato de potasio. Llevar a pH 6. Esterilizar por filtración y fraccionar en alícuotas de 2 ml. Conservar en el freezer.

7.2 Esculina y hierro férrico

Esculina	1.0 g
Citrato férrico amoniacal	0.5 g

8. Agar BCM (Biosynth Chromogenic Medium)

Este medio se encuentra disponible en el comercio. Se caracteriza por contener un sustrato cromogénico para la fosfatidilinositol-fosfolipasa C específica. Esta enzima permite la diferenciación de *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* de otras especies de *Listeria*. Seguir las instrucciones del fabricante

9. Agar ALOA (Agar Listeria de acuerdo a Ottaviani y Agosti)

(Es aceptable la utilización de otro medio disponible en el comercio de igual fórmula)

9.1 Medio base

Digestivo enzimático de tejido animal	18.0 g
Digestivo enzimático de caseína	6.0 g
Extracto de levadura	10.0 g
Piruvato de sodio	2.0 g
Glucosa	2.0 g
Gliscerofosfato de magnesio	1.0 g
Sulfato de magnesio (anhidro)	0.5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Cloruro de litio	10.0 g
Disodio hidrógeno fosfato (Na ₂ HPO ₄)	2.5 g
5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-glucopiranosido	0.05 g
Agar	12 g a 18 g ^a
Agua destilada	930 ml ^b
^a dependiendo del poder gelificante del agar	
^b 926 ml si se utiliza la solución de Anfotericina B	

Disolver los componentes deshidratados o el medio base completo deshidratado en agua destilada, llevando a ebullición con constante agitación, hasta completa disolución. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 7.2 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. E sterilizar a 121°C durante 15 minutos.

9.2 Solución de sal sódica de ácido nalidíxico

Sal sódica de ácido nalidíxico	0.02 g
Solución de hidróxido de sodio 0.05 mol/ l de solución	5.0 ml

Disolver la sal de ácido nalidíxico en el hidróxido de sodio y esterilizar por filtración.

9.3 Solución de Ceftazidima

Ceftazidima	0.02 g
Agua destilada	5.0 ml

Disolver la ceftazidima en agua y esterilizar por filtración, con membrana de 0.45 μm.

9.4 Solución de Polimixina B

Polimixina B	76 700 IU
Agua destilada	5.0 ml

Disolver la polimixina B en agua y esterilizar por filtración, con membrana de 0.45 μm

9.5 Suplemento de antibiótico

9.5.1 Solución de cicloheximida

Cicloheximida	0.05 g
Metanol	2.5 ml
Agua destilada	2.5 ml

Disolver la cicloheximida en el metanol y luego agregar el agua. Esterilizar por filtración, con membrana de 0.45 µm.

9.5.2 Solución de anfotericina B (como alternativa de la solución de cicloheximida)

Anfotericina B	0.01 g
Ácido clorhídrico (1 mol/l)	2.5 ml
Dimetilformamida (DMF)	7.5 ml

Disolver la anfotericina en la solución de HCl/DMF. Esterilizar por filtración, con membrana de 0.45 µm

PRECAUCIÓN: La solución de HCl/DMF es tóxica, manipular con cuidado.

9.6 Suplemento

Disolver 2 g de L – α - fosfatidil inositol (Sigma P6636) ® en 50 ml de agua fría. Mezclar alrededor de 30 minutos hasta obtener una suspensión homogénea. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos y enfriar a 4 8°C - 50°C.

NOTA: Sigma P6636 es una marca comercial. Se puede utilizar un producto equivalente que demuestre tener el mismo resultado.

9.7 Medio completo

Medio base (3.1)	930 ml ^a
Solución de sal sódica de ácido nalidíxico (3.2)	5 ml
Solución de ceftazidima (3.3)	5 ml
Solución de polimixina B (3.4)	5 ml
Solución de cicloheximida (3.5.1) o	5 ml
Solución de anfotericina B (3.5.2)	10 ml
Suplemento (3.6)	50 ml
^a 925 ml si se utiliza solución de Anfotericina B	

Agregar las correspondientes soluciones al medio fundido y enfriado a aproximadamente 50°C, mezclar suavemente entre cada adición. El pH del medio completo debe ser de 7.2 ± 0.2 a 25°C. El medio es homogéneamente opaco.

En cada placa de Petri agregar de 15 ml a 20 ml del medio recientemente preparado y dejar solidificar.

10. Agar cromogénico para *Listeria* (Chromogenic *Listeria* Agar)

Este medio es comercializado por OXOID. Se caracteriza por contener el sustrato Lecitina, que permite la diferenciación de *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* de otras especies de *Listeria*. Seguir las instrucciones del fabricante.

11. CHROMagar Listeria

Este medio se encuentra disponible en el comercio. Se caracteriza por contener un sustrato cromogénico que permite la diferenciación de *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* de otras especies de *Listeria*. Seguir las instrucciones del fabricante.

12. Agar sangre de oveja

12.1 Agar Base

Peptona de carne	15.0 g
Digestivo de hígado	2.5 g
Extracto de levadura	5.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Agar	9.0 a 18.0 g ¹
Agua	1000 ml
¹ Dependiendo del poder gelificante del agar	

Disolver los componentes en agua destilada, calentando con constante agitación hasta completa disolución. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de $7.2 \pm 0,2$ a 25°C después de la esterilización. Fraccionar en frascos de capacidad adecuada. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

12.2 Sangre desfibrinada de oveja

12.3 Medio completo

Base (12.1)	100 ml
Sangre desfibrinada de oveja (12.2)	5 ml a 7 ml

Agregar la sangre al medio base previamente fundido y enfriado a aprox. 47°C. Mezclar bien. Dispensar en placas de Petri y dejar solidificar.

13. Caldo púrpura de bromocresol para carbohidratos (con dextrosa, esculina, maltosa, ramnosa, manitol y xilosa)

Proteosa peptona N°3	10.0 g
Extracto de carne	1.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los ingredientes (omitiendo los carbohidratos) en 800 ml de agua destilada, calentando y agitando suavemente. Dispensar 2.0 ml en tubos de 13 x 100 mm que contengan una campanita de fermentación invertida (campana de Durham). Autoclavar a 118°C durante 15 minutos y dejar enfriar. Disolver 5 g de cada carbohidrato en 200 ml de agua destilada, y esterilizar por filtración. Adicionar 0.5 ml de la solución filtrada en cada tubo con caldo base, después

de enfriarlo a 45°C. Agitar suavemente para mezclar . Ajustar el pH final a 6.8 ± 0.2.

14. Caldo nutritivo

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	5.0 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada, calentando con constante agitación hasta completa disolución. Fraccionar en tubos. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

15. Caldo nitrato

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	5.0 g
Nitrato de potasio (KNO ₃)	1.0 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada. Fraccionar 5 ml en tubos. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Ajustar el pH final a 7.0 ± 0.2.

16. Reactivos para la prueba de reducción de nitrato

16.1 Reactivo A: de ácido sulfanílico

Acido sulfanílico	1.0 g
Acido acético 5 N	125 ml

16.2 Reactivo B: Dihidroclorehidrato de N- (l-naftil) etilendiamina

Dihidroclorehidrato de N- (l-naftil) etilendiamina	0.25 g
Acido acético 5 N	200 ml

Conservar en frasco de vidrio oscuro con tapa

17. Medio SIM (para prueba de movilidad)

Digestivo enzimático de caseína	20.0 g
Digestivo enzimático de tejido animal	6.1 g
Sulfato ferroso de amonio	0.2 g
Tiosulfato de sodio	0.2 g
Agar	3.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada, calentando a ebullición hasta completa disolución. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de $7.3 \pm 0,2$ a 25°C después de la esterilización. Fraccionar en tubos en cantidad de 6 ml aproximadamente. Esterilizar de acuerdo a indicaciones del fabricante.

NOTA: Este medio se encuentra disponible en BBL (no utilizar SIM de Difco)

18. Medio para test de movilidad (agar semisólido)

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	10.0 g
Agar	4.0 g
Agua destilada	1000 ml

Calentar con suave agitación hasta que se disuelva el agar. Fraccionar 8 ml en tubos de ensayo de 16 x 150 mm con tapa a rosca. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Luego, enfriar a 45°C y almacenar en refrigeración.

Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 7.4 ± 0.2 después de la esterilización.

ANEXO 3: Fotos

1. Agar Oxford Modificado



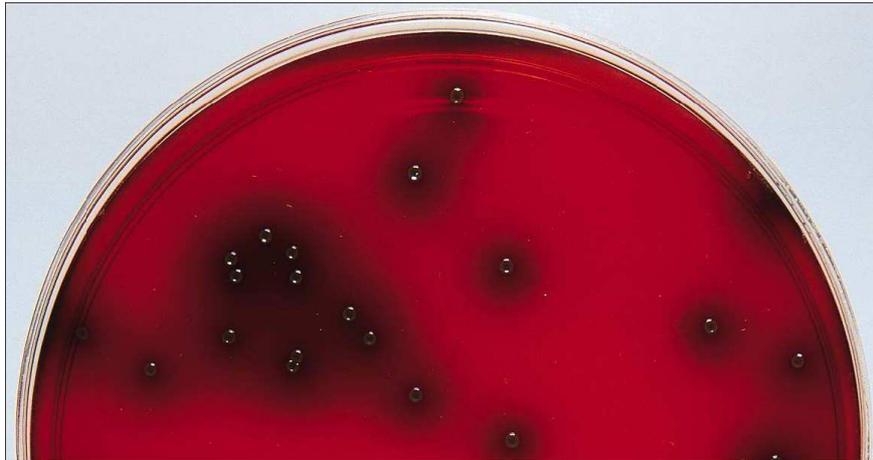
Listeria monocytogenes: colonias típicas pequeñas (aproximadamente 1mm) y rodeadas por un halo de oscurecimiento.

2. Agar Listeria Ottaviani Agosti (ALOA)



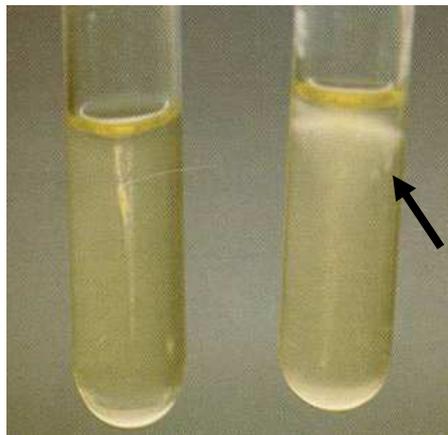
Listeria monocytogenes: colonias típicas color verde - azulado rodeadas por un halo opaco.

3. Agar PALCAM



Listeria monocytogenes: colonias típicas color verde-oliva rodeadas por un halo negro.

4. Test de movilidad



Listeria monocytogenes: crecimiento en forma de paraguas (foto derecha).

5. REFERENCIAS

FDA U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 10. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. April 2011 Edition.

DetECCIÓN de *Listeria monocytogenes* en alimentos

(Procedimiento según International Standard ISO 11290-1: 2004)

1. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar la detección, aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* en muestras de alimentos.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica para realizar la detección, aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* en muestras de alimentos.

NOTA: Una vez identificado el microorganismo como *Listeria monocytogenes* por propiedades bioquímicas y morfológicas, la cepa debe ser enviada al Centro de Referencia Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbrán”, para una mayor caracterización.

3. DESARROLLO

3.1. Medios de cultivo, reactivos, materiales y equipos

- 3.1.1 Caldo Half Fraser (HFB)
- 3.1.2 Caldo Fraser (FB)
- 3.1.3 Agar Listeria de acuerdo a Ottaviani y Agosti (ALOA) u otro medio disponible en el comercio de igual fórmula
- 3.1.4 Segundo medio de aislamiento selectivo a elección del laboratorio: como por ejemplo Oxford o Palcam
- 3.1.5 Agar triptona soja extracto de levadura (TS-YEA)
- 3.1.6 Caldo triptona soja extracto de levadura (TS-YEB)
- 3.1.7 Agar sangre de oveja
- 3.1.8 Caldo para la utilización de carbohidratos (ramnosa y xilosa)
- 3.1.9 Agar movilidad (opcional)
- 3.1.10 Suspensión de glóbulos rojos de oveja (opcional)
- 3.1.11 Medio CAMP (Christie, Atkins, Munch - Petersen)
- 3.1.12 Solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)
- 3.1.13 Para realizar la identificación bioquímica se pueden utilizar Kits de pruebas bioquímicas capaz de identificar *Listeria monocytogenes*. (ej. Galería API Listeria, bioMérieux) (opcional)

- 3.1.14 Estufa de esterilización
- 3.1.15 Autoclave
- 3.1.16 Balanza electrónica capaz de pesar 25 ± 0.1 g
- 3.1.17 Estufa de incubación a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 3.1.18 Estufa de incubación a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ o $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- 3.1.19 Estufa de incubación a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$
- 3.1.20 Baño de agua a $47^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 3.1.21 Vórtex
- 3.1.22 Stomacher
- 3.1.23 Bolsas para Stomacher con o sin filtro de capacidad adecuada.
- 3.1.24 Ansa de platino o níquel de aproximadamente 3 mm de diámetro ó 10 μl .
- 3.1.25 Aguja de inoculación
- 3.1.26 Espátula de Drigalsky
- 3.1.27 Tubos y frascos de vidrio de capacidad adecuada.
- 3.1.28 Peachímetro calibrado con exactitud de 0.1 unidad de pH a 20°C - 25°C .
- 3.1.29 Pipetas graduadas o automáticas de 1 ml y de 100 μl de capacidad nominal
- 3.1.30 Pipetas de 10 ml
- 3.1.31 Jarra para incubación en microaerofilia (opcional)
- 3.1.32 Mezcla de gases para incubación en microaerofilia: 5 % a 12 % de CO_2 , 5 % a 15 % de O_2 y 75 % de N_2 (opcional)
- 3.1.33 Equipo para el test de iluminación de Henry (opcional)
- 3.1.34 Microscopio preferiblemente con contraste de fase
- 3.1.35 Porta y cubreobjetos
- 3.1.36 Placas de Petri de 90 a 100 mm de diámetro.

3.2. Cepas

- 3.2.1. Cepa de *Listeria monocytogenes* como control positivo: pueden ser ATCC 19111, NCTC 7973 u otro cultivo de *Listeria monocytogenes* validado.
- 3.2.2. Cepa de *Listeria innocua* como control negativo: puede ser ATCC 33090 u otro cultivo de *Listeria innocua* validado.
- 3.2.3. Otras cepas de *Listeria spp.* como *L. seeligeri*, *L. grayi* y *L. ivanovii* pueden ser requeridas como controles para pruebas confirmatorias adicionales.
- 3.2.4. Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ó NCTC 1803 y *Rhodococcus equi* NCTC 6121 ó ATCC 6939 para realizar el test de CAMP tradicional.

3.3. Principio

3.3.1. Enriquecimiento primario

Siembra de la muestra en el medio de enriquecimiento líquido selectivo Caldo Half Fraser que contiene una concentración reducida de agente selectivo (un volumen de cloruro de litio y la mitad de volumen de acriflavina y ácido nalidíxico). Incubación a 30°C durante 24 h.

3.3.2. Enriquecimiento secundario:

Inoculación del medio de enriquecimiento líquido selectivo Caldo Fraser (que contiene una concentración completa de agente selectivo) con el cultivo obtenido en 3.3.1. Incubar a 35°C ó 37°C durante 48 h.

3.3.3. Estriado en placa e identificación

A partir de los cultivos obtenidos en 3.3.1 y 3.3.2. estriar en los dos medios sólidos selectivos:

- Agar Listeria de acuerdo a Ottaviani y Agosti (ALOA)
- Segundo medio sólido selectivo a elección del laboratorio complementario al ALOA, como por ejemplo Oxford o PALCAM.

Incubar el ALOA a 37°C ± 1°C y revisar después de 24 h ± 3 h y si es necesario incubar por 24 h ± 3 h más para observar las colonias características de *Listeria monocytogenes*.

Incubar el segundo agar selectivo de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

NOTA: ALOA es un ejemplo de un medio apropiado disponible en el comercio. La utilización de otro medio con la misma fórmula está permitida.

3.3.4. Confirmación

Aislamiento de las colonias sospechosas de *L. monocytogenes* obtenidas en 3.3.3. y confirmación por características morfológicas y propiedades bioquímicas.

3.4. Procedimiento

3.4.1. Preparación de la muestra

Los envases intactos de las muestras deben ser desinfectados en el sitio de la incisión inmediatamente antes de realizar la misma para la toma de muestra. Para la desinfección se puede utilizar: peróxido de hidrógeno al 3 %, etanol al 70 %, o isopropanol al 70%. Si el envase no parece estar limpio lavar antes de la desinfección con agua y jabón y luego enjuagar.

3.4.2. Primer enriquecimiento selectivo

Pesar x g de la muestra y agregar 9x ml de caldo Half Fraser (HFB), para llevar a una dilución 1/10. Por ejemplo si se pesa 25 g de muestra agregar 225 ml de HFB y homogeneizar durante 2 minutos ± 0.2 minutos en Stomacher. Incubar durante 24 h ± 2 h a 30°C ± 2°C.

3.4.3. Segundo enriquecimiento en caldo Fraser

Transferir 0.1 ml ± 0.02 ml del caldo HFB obtenido en 3.4.2. en 10 ml ± 0.5 ml de Caldo Fraser (FB) e incubar a 35°C ó 37°C, 48 h ± 2 h.

3.4.4. Estriado en placas de agar selectivo

A partir de los medios de enriquecimientos obtenidos en 3.4.2. (HFB) y 3.4.3. (FB) sembrar una ansada o una gota de aproximadamente 0.1 ml y distribuir con espátula de Drigalsky sobre la superficie del Agar Listeria de acuerdo a Ottaviani y Agosti (ALOA) y del segundo medio selectivo.

Incubar el ALOA a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ y si es necesario incubar $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ más.

Incubar el segundo medio selectivo siguiendo las instrucciones del fabricante.

Examinar las placas después de la incubación para la determinación de la presencia de colonias características de *Listeria monocytogenes*:

ALOA: las colonias típicas de *L. monocytogenes* son verdes azuladas rodeadas por un halo opaco. Si el crecimiento es débil o no se observan colonias o no hay presencia de colonias típicas incubar $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ más.

NOTA 1: algunas especies de *L. monocytogenes* presentan un halo muy débil o pueden no presentar halo en caso de estrés en particular por estrés ácido.

NOTA 2: algunas *L. monocytogenes* se caracterizan por tener una actividad PIPLC (Fosfatidil inositol fosfolipasa C) lenta. Dichas bacterias se detectan cuando el tiempo de incubación es mayor a 4 días. Algunas de estas especies podrían ser patogénicas.

Segundo medio selectivo: Examinar las placas después del tiempo apropiado de incubación para observar la presencia de colonias características de *Listeria* spp o *L. monocytogenes*, dependiendo del medio.

3.4.5. Confirmación de *Listeria* spp

3.4.5.1. Para la confirmación seleccionar de cada placa obtenida en 3.4.4 cinco colonias sospechosas de *Listeria* spp., si en algunas de las placas hay menos de cinco colonias seleccionar todas.

3.4.5.2. Estriar las colonias seleccionadas en la superficie de una placa de agar Triptona soja extracto de levadura (TS-YEA) para obtener colonias aisladas. Incubar las placas a 35°C ó 37°C durante 18 h a 24 h hasta obtener un crecimiento satisfactorio.

Las colonias típicas de *Listeria* spp en el agar TS-YEA son de 1mm a 2 mm de diámetro, convexas, incoloras y opacas con bordes definidos. Si las colonias no están bien aisladas picar una colonia típica de *Listeria* spp. y estriar en otra placa de TS-YEA.

3.4.5.3. Prueba de la catalasa: tomar una colonia aislada y suspender en una gota de solución de peróxido de hidrógeno en un portaobjeto. Una reacción positiva se ve por la formación inmediata de burbujas de gas

3.4.5.4. Coloración de Gram: realizar la coloración de Gram. *Listeria* spp. se presenta como bacilos Gram positivos cortos y delgados.

3.4.5.5. Prueba de la movilidad: a partir de una colonia aislada inocular el caldo TS-YEB, incubar de 8 h a 24 h a 25°C . Luego de la incubación depositar una gota del cultivo entre porta y cubreobjeto bien limpio y

examinar en el microscopio. *Listeria* spp. aparece como bacilos cortos, delgados y con movimientos característicos en tumbos (tumbling).

Otra alternativa es sembrar, a partir de una colonia aislada en TS-YEA, y con una aguja de inoculación, un agar movilidad. Incubar 48 h a 25°C. Examinar el crecimiento alrededor de la inoculación. *Listeria* spp. da un crecimiento característico en forma de paraguas (umbrella), inmediatamente por debajo de la superficie del agar. Si el crecimiento no es suficiente incubar 5 días más y examinar el cultivo durante ese tiempo.

3.4.6. Confirmación de *Listeria monocytogenes*

3.4.6.1. Test de hemólisis

Si las características morfológicas, fisiológicas y la prueba de la catalasa son indicativas de *Listeria* spp., inocular el agar sangre de oveja para realizar el test de hemólisis.

Secar bien la superficie del agar sangre de oveja antes de usar y, a partir de una colonia aislada, sembrar con aguja, utilizando un espacio para cada cultivo. Simultáneamente sembrar un control positivo (*L. monocytogenes*) y un control negativo (*L. innocua*).

Incubar a 35°C ó a 37°C durante 24 h \pm 2 h.

Después de la incubación examinar las cepas control:

- *L. monocytogenes*: produce una delgada y clara zona de β - hemólisis
- *L. innocua*: no produce zona de hemólisis
- *L. seeligeri*: produce una zona de hemólisis débil
- *L. ivanovii*: generalmente produce una amplia y clara zona de β - hemólisis

Examinar las placas bajo luz brillante para comparar los cultivos con los controles.

El test de hemólisis también puede realizarse utilizando glóbulos rojos de sangre de oveja:

Dispersar la colonia aislada en 150 ul de caldo Triptona soja extracto de levadura (TS-YEB), incubar a 37°C durante 2 h. Agregar 150 ul de glóbulos rojos de sangre de oveja. Incubar a 37°C durante 15 a 60 minutos. Luego refrigerar a 3°C \pm 2°C durante aproximadamente 2 h. Examinar la actividad hemolítica. Si la reacción no es definida, dejar a 3°C \pm 2°C durante 24h \pm 3h.

3.4.6.2. Utilización de carbohidratos (ramnosa y xilosa)

A partir del cultivo obtenido en TS-YEB, inocular con un ansa cada uno de los caldos para utilización de carbohidratos. Incubar a 35°C ó a 37°C hasta 5 días. Una reacción positiva (formación de ácido) se visualiza por una coloración amarilla, que generalmente sucede dentro de las 24 h ó 48 h.

3.4.6.3. Prueba de CAMP (figura A)

3.4.6.3.1. En una placa de agar sangre de oveja estriar una línea simple de *S. aureus* ATCC 25923 ó ATCC 4944 y, en forma paralela, otra línea simple de *Rhodococcus equi* ATCC 6939, separadas entre si 3 - 4 cm. Utilizar un ansa o aguja de inoculación.

3.4.6.3.2. Estriar los cultivos test en una línea simple y perpendicular entre las dos líneas de cultivos de referencia. Las líneas de cultivo test deben estar separadas de las de referencia 2 - 4 mm. Durante el estriado las líneas test y referencia no se deben tocar para evitar contaminación cruzada.

3.4.6.3.3. Simultáneamente estriar cultivos controles de *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *L. ivanovii*

3.4.6.3.4. Incubar 18 h a 24 h a 35° ó 37°C. Si se utiliza agar doble capa, incubar a 37°C ó 35°C de 12 h a 18 h.

3.4.6.3.5. Se considera reacción positiva una zona acrecentada de β -hemólisis en la intersección de los cultivos test y los cultivos de *S.aureus* y *R.equi*.

3.4.6.3.6. Una reacción positiva para *R. equii* se ve como una amplia zona (5 a 10 mm) en forma de "cabeza de flecha" de hemólisis. La reacción es negativa si se presenta como una pequeña zona (alrededor de 1 mm) de hemólisis débil en la intersección del cultivo test con la zona de difusión de *R.equi*.

3.4.6.3.7. Una reacción positiva para *S.aureus* se ve como una pequeña zona de hemólisis acrecentada que se extiende alrededor de 3 a 4 mm del cultivo test y dentro de la zona de hemólisis débil debida al crecimiento del cultivo de *S.aureus*. No ocurre una zona grande de β -hemólisis en la proximidad de las áreas entre *S.aureus* y *L. monocytogenes*.

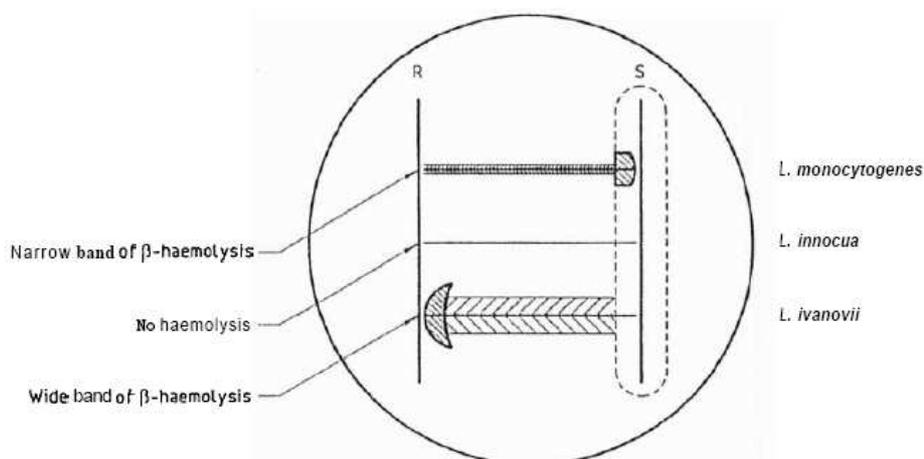


Figura A: Prueba de Camp

3.4.7. Interpretación de propiedades morfológicas, fisiológicas y reacciones bioquímicas

Todas las especies de *Listeria* spp. son bacilos cortos Gram positivos móviles, catalasa positivos.

Listeria monocytogenes se distingue de las demás especies por las propiedades presentadas en la siguiente tabla.

Especie	Hemólisis	Producción de ácido		Test de CAMP	
		ramnosa	xilosa	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. grayi sub. grayi</i>	-	-	-	-	-
<i>L. grayi sub. murrayi</i>	-	V	-	-	-

V: reacción variable

(+): reacción positiva débil

+: > del 90 % reacciones positivas

-: reacción negativa

NOTA: existen algunas cepas raras de *L. monocytogenes* que no dan β – hemólisis y dan reacción de CAMP negativa.

3.4.8. Control de cultivos

Para controlar la capacidad de los medios de enriquecimiento y los medios de identificación de modo de lograr un crecimiento selectivo de *L. monocytogenes*, sembrar en un frasco control con el primer medio de enriquecimiento selectivo (HFB) una dilución de un cultivo recientemente aislado de *L. monocytogenes* y de una cepa de control negativo (ej. *Streptococcus*).

Agregar de 10 a 100 células de *L. monocytogenes* y de la cepa de control negativo por frasco.

Proceder con el frasco control de igual manera que la muestra, para demostrar que la cepa de control positivo es recuperada.

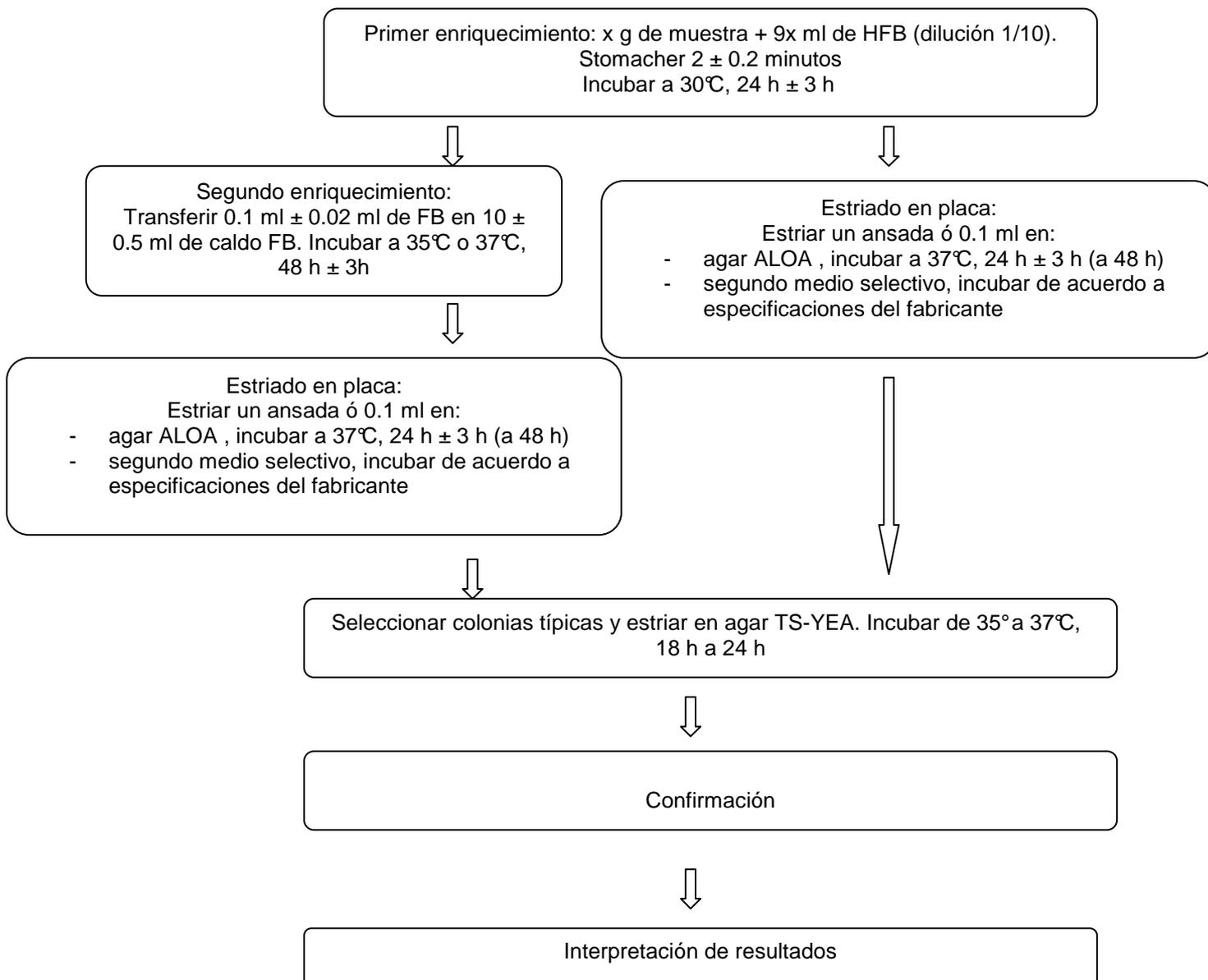
3.4.9. Expresión de resultados

De acuerdo a la interpretación de los resultados indicar presencia o ausencia de *Listeria monocytogenes* en la cantidad de muestra analizada (por gramos o mililitros para muestras líquidas).

NOTA: Una vez identificado el microorganismo como *Listeria monocytogenes* por propiedades bioquímicas, la cepa debe ser enviada al Centro de Referencia Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbrán”, para una mayor caracterización.

4. ANEXOS

ANEXO 1: Diagrama de flujo del procedimiento para la detección de *Listeria monocytogenes*



ANEXO 2: Medios de cultivos, propiedades bioquímicas y reactivos

1. Caldo Half Fraser (HFB)

1.1 Caldo base

Peptona de carne (digestivo péptico de tejido animal)	5.0 g
Triptona (digestivo péptico de caseína)	5.0 g
Extracto de carne	5.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	20.0 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH_2PO_4)	1.35 g
Disodio hidrógeno fosfato (Na_2HPO_4)	12.0 g
Esculina	1.0 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 7.2 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. NO SOBRECALENTAR, enfriar después de esterilizar. Si el medio se oscurece o ennegrece, fue sometido a sobrecalentamiento y debe ser descartado.

1.2 Solución de cloruro de litio

Cloruro de litio	3.0 g
Agua	10 ml

Agregar el cloruro de litio al agua, y esterilizar por filtración.

ADVERTENCIA: tomar todas las precauciones necesarias cuando se disuelve el cloruro de litio en agua, ya que la reacción es fuertemente exotérmica. La solución irrita las membranas mucosas.

1.3 Solución de sal sódica de ácido nalidíxico

Sal sódica de ácido nalidíxico	0.1 g
Solución de hidróxido de sodio 0.05 mol/ l de solución	10 ml

Disolver la sal de ácido nalidíxico en el hidróxido de sodio, y esterilizar por filtración.

1.4 Solución de clorhidrato de acriflavina

Clorhidrato de acriflavina	0.25 g
Agua destilada	100 ml

Disolver el clorhidrato de acriflavina en agua, y esterilizar por filtración.

1.5 Solución de citrato amoniacal férrico

Citrato amoniacal férrico	5.0 g
Agua destilada	100 ml

Disolver el citrato amoniacal férrico en agua, y esterilizar por filtración.

1.6 Medio completo

Caldo Base (1.1)	100 ml
Solución de cloruro de litio (1.2)	1.0 ml
Solución de sal sódica de ácido nalidíxico (1.3)	0.1 ml
Solución clorhidrato de acriflavina (1.4)	0.5 ml
Solución de citrato amoniacal férrico (1.5)	1.0 ml

Inmediatamente antes del uso agregar las cuatro soluciones (de 1.2 a 1.5) a 100 ml del medio base (1.1)

2. Caldo Fraser (FB)

2.1 Caldo Base

Peptona de carne (digesto péptico de tejido animal)	5.0 g
Triptona (digesto péptico de caseína)	5.0 g
Extracto de carne	5.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	20.0 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH_2PO_4)	1.35 g
Disodio hidrógeno fosfato (Na_2HPO_4)	12.0 g
Esculina	1.0 g
Cloruro de litio	3.0 g
Sal sódica de ácido nalidíxico	0.02 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada y fraccionar en tubos, en porciones de 10 ml. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 7.2 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. NO SOBRECALENTAR. Enfriar después de esterilizar. Si el medio se oscurece o ennegrece, fue sometido a sobrecalentamiento y debe ser descartado. Guardar en refrigeración.

2.2 Solución de clorhidrato de acriflavina

Ver 1.4

2.3 Solución de citrato amoniacal férrico

Ver 1.5

2.4 Medio completo

Inmediatamente antes del uso agregar a cada tubo con 10 ml de medio base (2.1) 0.1 ml de solución de clorhidrato de acriflavina (2.2) y 0.1 ml de solución de citrato amoniacal férrico (2.3). Mezclar suavemente

3. Agar Listeria de acuerdo a Ottaviani y Agosti (ALOA)

(Es aceptable la utilización de otro medio disponible en el comercio de igual fórmula)

3.1 Medio base

Digestivo enzimático de tejido animal	18.0 g
Digestivo enzimático de caseína	6.0 g
Extracto de levadura	10.0 g
Piruvato de sodio	2.0 g
Glucosa	2.0 g
Glicerofosfato de magnesio	1.0 g
Sulfato de magnesio (anhidro)	0.5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Cloruro de litio	10.0 g
Disodio hidrógeno fosfato (Na ₂ HPO ₄)	2.5 g
5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-glucopiranosido	0.05 g
Agar	12 g a 18 g ^a
Agua destilada	930 ml ^b
^a dependiendo del poder gelificante del agar	
^b 926 ml si se utiliza la solución de Anfotericina B	

Disolver los componentes deshidratados o el medio base completo deshidratado en agua destilada llevando a ebullición, con constante agitación, hasta completa disolución. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 7.2 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos

3.2 Solución de sal sódica de ácido nalidíxico

Sal sódica de ácido nalidíxico	0.02 g
Solución de hidróxido de sodio 0.05 mol/ l de solución	5.0 ml

Disolver la sal de ácido nalidíxico en el hidróxido de sodio, y esterilizar por filtración.

3.3 Solución de Ceftazidima

Ceftazidima	0.02 g
Agua destilada	5.0 ml

Disolver la ceftazidima en agua, y esterilizar por filtración con membrana de 0.45 μm

3.4 Solución de Polimixina B

Polimixina B	76 700 IU
Agua destilada	5.0 ml

Disolver la polimixina B en agua, y esterilizar por filtración con membrana de 0.45 μm

3.5 Suplemento de antibiótico

3.5.1 Solución de cicloheximida

Cicloheximida	0.05 g
Metanol	2.5 ml
Agua destilada	2.5 ml

Disolver la cicloheximida en el metanol y luego agregar el agua. Esterilizar por filtración con membrana de 0.45 μ m

3.5.2 Solución de anfotericina B (como alternativa de la solución de cicloheximida)

Anfotericina B	0.01 g
HCl (1mol/l)	2.5 ml
Dimetilformamida (DMF)	7.5 ml

Disolver la anfotericina en la solución de HCl/DMF. Esterilizar por filtración con membrana de 0.45 μ m

PRECAUCION: La solución de HCl / DMF es tóxica, manipular con cuidado.

3.6 Suplemento

Disolver 2 g de L- α - fosfatidil inositol (Sigma P6636) ® en 50 ml de agua fría. Mezclar alrededor de 30 minutos hasta obtener una suspensión homogénea. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos, y enfriar a 48°C - 50°C.

NOTA: Sigma P6636 es una marca comercial. Se puede utilizar un producto equivalente que demuestre tener el mismo resultado.

3.7 Medio completo

Medio base (3.1)	930 ml ^a
Solución de sal sódica de ácido nalidíxico (3.2)	5 ml
Solución de ceftazidima (3.3)	5 ml
Solución de polimixina B (3.4)	5 ml
Solución de cicloheximida (3.5.1) o Solución de anfotericina B (3.5.2)	5 ml
Suplemento (3.6)	10 ml
	50 ml
^a 925 ml si se utiliza solución de Anfotericina B	

Agregar las correspondientes soluciones al medio fundido y enfriado a aproximadamente a 50°C. Mezclar suavemente entre cada adición. El pH del medio completo debe ser de 7.2 \pm 0.2 a 25°C. El medio es homogéneamente opaco.

En cada placa de Petri agregar de 15 ml a 20 ml del medio recientemente preparado y dejar solidificar.

4. Agar Triptona soja extracto de levadura (TS-YEA)

Caldo triptona soja ¹	30.0 g
Extracto de levadura	6.0 g
Agar	9.0 18.0 g ²
Agua destilada	1000 ml
¹ Triptona	17.0 g
Peptona de soja	3.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Dipotasio hidrógeno fosfato (K ₂ HPO ₄)	2.5 g
Glucosa	2.5 g
² Dependiendo del poder gelificante del agar	

Disolver los componentes deshidratados o el medio base completo deshidratado en agua destilada, llevando a ebullición con constante agitación, hasta completa disolución. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 7.3 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Fraccionar el medio en tubos de capacidad adecuada, esterilizar a 121°C durante 15 minutos, y dejar solidificar en posición inclinada para obtener un pico de flauta.

Para la preparación de las placas, en cada placa de Petri agregar de 15 ml a 20 ml del medio y dejar solidificar.

5. Caldo Triptona soja extracto de levadura (TS-YEB)

Caldo triptona soja ¹	30.0 g
Extracto de levadura	6.0 g
Agua destilada	1000 ml
¹ Triptona	17.0 g
Peptona de soja	3.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Dipotasio hidrógeno fosfato (K ₂ HPO ₄)	2.5 g
Glucosa	2.5 g

Disolver los componentes deshidratados o el medio base completo deshidratado en agua destilada calentando, si es necesario. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 7.3 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Fraccionar el medio en tubos de capacidad adecuada. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

6. Agar sangre de oveja

6.1 Agar Base

Peptona de carne	15.0 g
Digestivo de hígado	2.5 g
Extracto de levadura	5.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Agar	9.0 a 18.0 g ¹
Agua	1000 ml
¹ Dependiendo del poder gelificante del agar	

Disolver los componentes en agua destilada calentando con constante agitación, hasta completa disolución. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de $7.2 \pm 0,2$ a 25°C después de la esterilización. Fraccionar en frascos de capacidad adecuada. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

6.2 Sangre desfibrinada de oveja

6.3 Medio completo

Base (6.1)	100 ml
Sangre desfibrinada de oveja (6.2)	5 ml a 7 ml

Agregar la sangre al medio base previamente fundido y enfriado a aprox. 47°C y mezclar bien. Dispensar en placas de Petri y dejar solidificar.

7. Suspensión de glóbulos rojos de oveja

Mantener los glóbulos rojos de oveja a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ antes del uso. Antes de utilizar, examinar la presencia de señales de hemólisis (enrojecimiento) en la capa superior del suero. Si no hay signos de hemólisis, introducir 2 ml de la capa inferior de los glóbulos rojos en 98 ml de buffer PBS.

Si hay signos de hemólisis, suspender aproximadamente 4 ml de la capa de glóbulos rojos en 10 ml de buffer PBS, mezclar suavemente y luego centrifugar. Si el líquido sobrenadante toma color rojo debido a una hemólisis significativa, descartar la suspensión. Si no toma color rojo, descartar el líquido sobrenadante y agregar 2 ml de la suspensión de glóbulos rojos a 98 ml de buffer PBS.

Mantener la suspensión hasta 5 días a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Descartar cuando ocurre hemólisis.

8. Caldo para utilización de carbohidratos (ramnosa y xilosa)

8.1 Caldo base

Proteasa peptona	10.0 g
Extracto de carne	1.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada con calentamiento, si es necesario. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 6.8 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Fraccionar en tu bos de capacidad adecuada y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

8.2 Solución de carbohidratos

Carbohidrato (L-ramnosa o D-xilosa)	5.0 g
Agua destilada	100 ml

Disolver separadamente cada carbohidrato en agua y esterilizar por filtración

8.3 Medio completo

Para cada carbohidrato, agregar asépticamente x ml de solución (8.2) a 9 x ml de caldo base (8.1)

9. Agar movilidad

Peptona de caseína	20.0 g
Peptona de carne	6.1 g
Agar	3.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada, calentando a ebullición hasta completa disolución. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 7.3 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Fraccionar en tubos en cantidad de 5 ml aproximadamente. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

10. Medios y cepas para la prueba de CAMP

Para este test se pueden utilizar las placas de agar sangre del punto 6.0, pero es preferible utilizar agar doble capa con una delgada capa de agar sangre.

10.1 Agar Base

Ver 6.1

10.2. Agar sangre de oveja

Ver 6.3

10.3. Medio completo

Dispensar 10 ml del medio base (6.1) en una placa de Petri, y dejar solidificar. Volcar una capa muy fina de agar sangre (6.3) utilizando una cantidad no mayor de 3 ml por placa. Dejar solidificar

Si el agar sangre es agregado a placas de agar base preparadas con anticipación, puede ser necesario calentar las placas por 20 min. en estufa a 37°C antes de volcar la capa de agar sangre.

10.4. Cepas para la prueba de CAMP

10.4.1. Cepas β -hemolíticas de *S.aureus*: ej. NCTC 1803 ó ATCC 25923

10.4.2. Cepas de *R.equi*: ej. NCTC 6121 ó ATCC 6939

10.4.3. Cepas de *L. monocytogenes*: ej. ATCC 19111, NCTC 7973 u otro cultivo de *L. monocytogenes* validado.

10.4.4. Cepas de *L. innocua*: ej. ATCC 33090 u otro cultivo de *L. innocua* validado

10.4.5. Cepas de *L. ivanovii*

11. Solución de peróxido de hidrógeno

Utilizar al 3 % (m/m), ej. 10 volúmenes

12. Buffer fosfato salino (PBS)

Disodio hidrógeno fosfato (Na_2HPO_4)	8.98 g
Sodio dihidrógeno fosfato (KH_2PO_4)	2.71 g
Cloruro de sodio (NaCl)	8.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 7.2 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

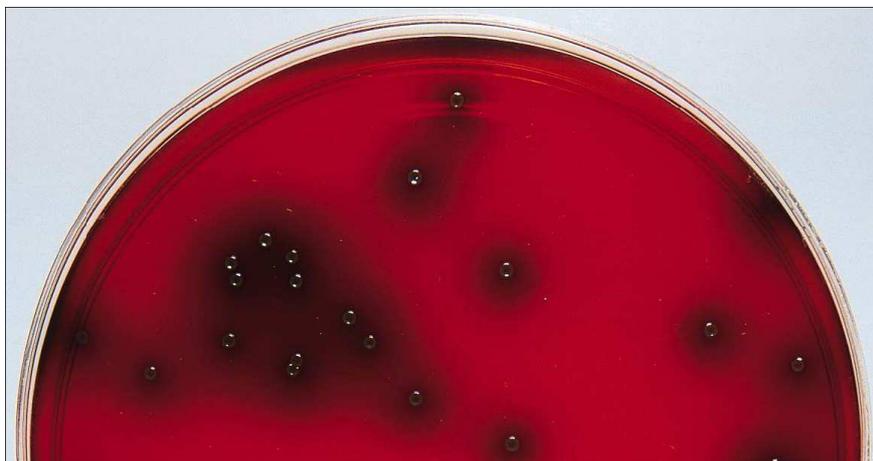
ANEXO 3: Fotos

1. Agar Listeria Ottaviani Agosti (ALOA)



Listeria monocytogenes: colonias típicas color verde-azulado rodeadas por un halo opaco.

2. Agar PALCAM



Listeria monocytogenes: colonias típicas color verde-oliva rodeadas por un halo negro.

5. REFERENCIAS

INTERNATIONAL STANDARD. ISO 11290-1: Microbiology of Food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: Detection. First edition 1996-12-15. AMENDMENT1 2004-10-15: Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data.

Enterobacter sakazakii **(*Cronobacter spp.*)** **en fórmulas infantiles en polvo**

1. Generalidades y nomenclatura

Enterobacter sakazakii (*Cronobacter spp.*) es una bacteria Gram - negativa que no forma esporas, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Fue llamada originalmente “*Enterobacter cloacae* de pigmentación amarilla” hasta 1980 cuando fue renombrada *Enterobacter sakazakii*. En el año 2008 CODEX reconoce un cambio en la nomenclatura, ya que por estudios moleculares independientes (incluyendo “f – AFLP”, “automated ribotyping, “full- length 16S rRNA gene sequencing” e hibridación de DNA) demostraron que *Enterobacter sakazakii* comprende por lo menos 6 especies, por lo que se resuelve la creación del género *Cronobacter* constituido por 5 especies, 1 genomoespecie y 3 subespecies.

- *Cronobacter sakazakii* (biogrupos 1-4, 7, 8, 11, 13)
- *Cronobacter malonaticus* (biogrupos 5, 9, 14)
- *Cronobacter muytjensii* (biogrupo 15)
- *Cronobacter turicensis* (biogrupo 16)
- *Cronobacter dublinensis* (biogrupos 6, 10, 12)
 - *C. dublinensis* subesp. *dublinensis* (biogrupo 12)
 - *C. dublinensis* subesp. *lausannensis* (biogrupo 10)
 - *C. dublinensis* subesp. *lactaridi* (biogrupo 6)

La creación de un nuevo género simplifica la inclusión de estos organismos potencialmente patógenos en la legislación (el género propuesto *Cronobacter* es sinónimo de *Enterobacter sakazakii*) y los esquemas de identificación actuales desarrollados para *Enterobacter sakazakii* siguen siendo aplicables para el género de *Cronobacter*. Es necesario ser conscientes de la existencia de las especies múltiples dentro de este grupo del organismo, para interpretar correctamente las pruebas de aislamiento e identificación, especialmente cuando estas se basan en métodos moleculares. (1)(2)

2. Epidemiología

Enterobacter sakazakii (*Cronobacter spp.*) ha surgido recientemente como patógeno en los lactantes. En las reuniones de expertos de FAO/OMS se determinó que el grupo de todos los lactantes (< de 12 meses de edad) era la población expuesta a especial riesgo de infección por *Enterobacter sakazakii*

(*Cronobacter spp.*). En este grupo, los neonatos (< de 28 días) presentan el mayor riesgo de infección, especialmente los prematuros, los lactantes con bajo peso al nacer (< 2500 g) y los inmunodeficientes, al igual que los lactantes menores de 2 meses. Los lactantes cuyas madres son seropositivas al VIH también corren riesgo, porque es posible que requieran específicamente preparados para lactantes y también que sean más vulnerables a las infecciones.

Se han documentado casos por *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) tanto casos esporádicos como brotes, donde las manifestaciones clínicas de la infección se presentan en forma de sepsis, meningitis, cerebritis y enterocolitis necrotizante.

Si bien la incidencia de estas infecciones por *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) en los lactantes parece ser baja, sus consecuencias pueden ser graves. Las principales manifestaciones por *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) en los lactantes, meningitis y bacteriemia, tienden a variar según la edad. La meningitis causada por *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) tiende a presentarse en los lactantes durante el período neonatal, mientras que la bacteriemia aparece, sobre todo, en los lactantes prematuros fuera del período neonatal y en la mayoría de los casos antes de los 2 meses de edad. Sin embargo, en los lactantes con inmunodeficiencia la bacteriemia se ha presentado hasta los 10 meses de edad; y lactantes anteriormente sanos también han presentado enfermedad invasiva fuera del período neonatal. Las infecciones se han presentado tanto en hospitales como en entornos ambulatorios.

Los índices de mortalidad notificados en los lactantes para las infecciones por *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) varían considerablemente, con índices tan altos como 50% de mortalidad en, al menos, un brote epidémico. Además, un porcentaje de los lactantes sobrevivientes queda con discapacidades permanentes, tales como retraso mental y otras enfermedades neurológicas (3) (4).

3. Fuente de infección

Aunque en algunos de los casos se determinó que los preparados en polvo eran la fuente de *E. sakazakii* (*Cronobacter spp.*), en muchos otros no se indicaron como fuente de la infección, ni desde el punto de vista epidemiológico ni microbiológico. No obstante, en esos casos tampoco se determinaron otras fuentes desde ninguna de las dos perspectivas. Debido a la gran difusión de *E. sakazakii* (*Cronobacter spp.*) es posible que los lactantes, los niños y los adultos estén expuestos a dicho organismo en una variedad de fuentes.

Los brotes epidémicos de infección por *E. sakazakii* (*Cronobacter spp.*) han llevado a establecer su vinculación con los preparados en polvo para lactantes, especialmente en entornos de cuidado intensivo para neonatos. Se sabe que *E. sakazakii* (*Cronobacter spp.*) está presente en bajas concentraciones en un porcentaje de estos preparados. Aunque el microorganismo ha sido detectado en otros tipos de alimentos y entornos ambientales, sólo los preparados para lactantes se han vinculado con brotes epidémicos.

E. sakazakii (*Cronobacter spp.*) puede introducirse en los preparados en polvo por cuatro vías:

- 1) a través de los ingredientes añadidos en las operaciones de mezclado en seco, durante la fabricación del preparado;
- 2) por contaminación del preparado a partir del ambiente de elaboración, durante las operaciones de secado o después de estas;
- 3) por contaminación del preparado tras la apertura del envase; y
- 4) durante la reconstitución del preparado que efectúa la persona que se ocupa del lactante, previamente a su administración, o después de haberlo reconstituido. (3)(4)

4. Prevención

En los lactantes expuestos a mayor riesgo, por ejemplo, en situaciones de cuidado neonatal intensivo, deberían usarse preparados líquidos esterilizados comercialmente siempre que estén disponibles, a menos que el médico que los atiende recomiende algo distinto. Si se escoge una opción alimenticia sin esterilidad comercial, debe usarse un procedimiento de descontaminación eficaz en el lugar de uso.

Las iniciativas de prevención deben ser multifacéticas, dirigidas a los fabricantes, a los proveedores de atención médica y a las guarderías, así como a las personas encargadas del cuidado de lactantes en el hogar, y deben tomar en consideración el riesgo que corren los lactantes tanto durante el período neonatal como después de él.

El etiquetado del producto, los programas de educación del consumidor y la capacitación del personal en los hospitales deberían actualizarse, según corresponda, para brindar la información adecuada a las personas encargadas del cuidado de los lactantes sobre el uso inocuo del producto, y para proporcionar advertencias sobre los peligros para la salud, que se derivan de la preparación y manipulación incorrectas de los preparados en polvo para lactantes. (3)

5. Normativa Nacional

5.1 Criterios microbiológicos

En el Código Alimentario Argentino (C.A.A), por una modificación en el artículo 1340 que entró en vigencia en el año 2007, se actualizaron los criterios microbiológicos para productos destinados a lactantes y niños de corta edad (artículo 1340: incisos E-A1 y E-A2). Por dicha incorporación, se establece el criterio microbiológico para *E. sakazakii* (*Cronobacter spp.*) en productos para lactantes que han de consumirse después de añadir un líquido, para la población de 0 a 6 meses. (5)

E) PRODUCTOS PARA LACTANTES Y NIÑOS DE CORTA EDAD:

E-A1: Productos para lactantes que han de consumirse después de añadir un líquido para la población de 0 a 6 meses

Parámetro	Criterio de aceptación	Metodología
Recuento de aerobios mesófilos (ufc/g) *	n=5, c=2, m=10 ³ , M=10 ⁴	ICMSF
Recuento de Enterobacterias (NMP/g)	n=10, c=2, m<3, M=10	ISO 21528-1:2004
<i>Salmonella</i> spp. / 25g	n= 30, c=0, Ausencia	ISO 6579: 2002
Detección de <i>Enterobacter sakazakii</i> / 10 g	n=30, c=0, Ausencia	ISO 22964: 2006

(*) No aplicable a los productos alimenticios en cuya elaboración intervienen procesos de fermentación por bacterias lácticas

E-A2 Productos para niños de corta edad que han de consumirse después de añadirse un líquido para la población de 6 a 12 meses

Parámetro	Criterio de aceptación	Metodología ⁽¹⁾
Recuento de aerobios mesófilos (ufc/g) *	n=5, c=2, m=10 ³ , M=10 ⁴	ICMSF
Recuento de Enterobacterias (NMP/g)	n=10, c=2, m<3, M=10	ISO 21528-1:2004
<i>Salmonella</i> spp. / 25g	n= 30, c=0, Ausencia	ISO 6579: 2002

(*) No aplicable a los productos alimenticios en cuya elaboración intervienen procesos de fermentación por bacterias lácticas

a. Implementación de un Sistema de HACCP

En el artículo 1346 bis del C.A.A., incorporado en el año 2008, se establece la obligatoriedad de la implementación de un Sistema de HACCP para los establecimientos que elaboren/industrialicen y/o fraccionen alimentos en polvo para lactantes y en el artículo 18 bis del C.A.A. se establecen las Directrices para la aplicación de un Sistema de HACCP.

Artículo 1346 bis - (Res Conj. SPReI y SAGPyA N°87 / 2008 y N°340 / 2008).
"Todo establecimiento que elabore/industrialice y/o fraccione alimentos en polvo para lactantes, incluidos en las Categorías a y b del Artículo 1353 del C.A.A., que requieran ser reconstituidos para su consumo, deberá implementar un Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) de

acuerdo a las directrices que constan en el Artículo 18 bis del presente Código.”(5)

Referencias:

1. CODEX. Alinorm 08/31/8. Mayo del 2008. Enmiendas a las normas y a los textos afines del CODEX.
2. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1: <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/7/64>
3. Código de prácticas de higiene para los preparados en polvo para lactantes y niños pequeños. CAC/RCP 66-2008
4. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula. Microbiological Risk Assessment Series. 6: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra6/en/>
5. Código Alimentario Argentino: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp

Detección, aislamiento e identificación de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) en fórmulas infantiles en polvo y en leche en polvo

(Procedimiento según Technical Specification ISO/TS 22964:2006)

1. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar la detección, aislamiento e identificación de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) en leche en polvo y fórmulas infantiles en polvo.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica para realizar la detección, aislamiento e identificación de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) en fórmulas infantiles en polvo y leche en polvo.

NOTA: Una vez identificado el microorganismo como *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) por propiedades bioquímicas, la cepa debe ser enviada al Centro de Referencia Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbrán” para una mayor caracterización.

3. DESARROLLO

3.1. Medios de cultivo, reactivos, materiales y equipos

- 3.1.1. Agua peptona bufferada (BPW)
- 3.1.2. Caldo lauril sulfato Triptosa modificado + vancomicina (LSTm/vancomicina)
- 3.1.3. Agar cromogénico para aislamiento de *Enterobacter sakazakii*
- 3.1.4. Triptona soja agar (TSA)
- 3.1.5. Solución de vancomicina (10 mg en 10 ml)
- 3.1.6. Prueba de la oxidasa
- 3.1.7. Caldo lisina decarboxilasa
- 3.1.8. Caldo ornitina decarboxilasa
- 3.1.9. Caldo L-arginina dehidrolasa
- 3.1.10. Medio para fermentación de carbohidratos (D-sorbitol, L-ramnosa, D-sucrosa, D-melobiosa y amigdalina)

- 3.1.11. Citrato de Simmons
- 3.1.12. Galería API 20 E, bioMerieux
- 3.1.13. Estufa de esterilización
- 3.1.14. Autoclave
- 3.1.15. Estufa de incubación: $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 3.1.16. Baño de agua a $44^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$
- 3.1.17. Peachímetro de exactitud 0.1 a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- 3.1.18. Pipetas de 1 ml de capacidad (para medir 0.1 ml)
- 3.1.19. Ansa de platino o níquel de aproximadamente 3 mm de diámetro
- 3.1.20. Tubos de ensayo de 18 mm de diámetro y 160 mm de largo con tapa
- 3.1.21. Placa de Petri de vidrio o plástico de 90 a 100 mm de diámetro

3.2. Principio

El método está basado en las siguientes etapas:

- 3.2.1. Enriquecimiento en medio líquido no selectivo
- 3.2.2. Enriquecimiento en medio líquido selectivo
- 3.2.3. Aislamiento en medio selectivo y diferencial
- 3.2.4. Confirmación bioquímica de colonias sospechosas aisladas.

3.3. Procedimiento

3.3.1. Preenriquecimiento

Pesar x g de la muestra en 9x ml de BPW (dilución 1/10). Dejar que la muestra se disuelva en el líquido, sin agitación. Si al cabo de 30 min la muestra no se disuelve, mezclar suavemente. Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 18 h \pm 2 h.

3.3.2. Enriquecimiento selectivo

Transferir 0.1 ml del cultivo obtenido en 4.3.1. a 10 ml de LSTm/vancomicina. Incubar a $44^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 24 h \pm 2 h.

Nota: Se recomienda utilizar baño de agua o estufa de incubación con aire forzado para asegurar que la temperatura máxima no exceda los 44.5°C .

3.3.3. Aislamiento presuntivo

Tomar un ansada del enriquecimiento 3.3.2. y estriar en una placa de agar cromogénico para aislamiento de *Enterobacter sakazakii*. Incubar a $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 h \pm 2 h.

Después de la incubación examinar la presencia de colonias típicas de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*)

Nota: las colonias típicas de *Enterobacter sakazakii* son de un tamaño mediano (1 a 3 mm), de color verde a verde azulado. Las colonias no típicas son generalmente transparentes y de color violeta.

3.3.4. Confirmación

3.3.4.1. Producción de pigmento amarillo

Seleccionar 5 colonias presuntivas (si hay menos de 5 colonias seleccionar todas) del medio obtenido en 3.3.3. y estriar por agotamiento en superficie en placas de TSA para obtención de colonias aisladas. Incubar las placas a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 44 h - 48 h.

Después de la incubación observar la presencia de colonias con pigmento amarillo.

Nota: Existen algunas cepas raras de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) que no producen pigmento amarillo en las condiciones especificadas en la técnica, o que pierden el pigmento por subcultivos, por lo tanto para las colonias sospechosas seleccionadas en el agar cromogénico y que no producen pigmentación amarilla en TSA, igual se procederá con la confirmación bioquímica.

3.3.4.2. Confirmación bioquímica

La confirmación bioquímica se realiza a partir de colonias aisladas en TSA. Se pueden utilizar Kits de pruebas bioquímicas comercialmente disponible capaces de identificar *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) o realizar pruebas bioquímicas en tubos.

Oxidasa: en un tubo de hemólisis, preparar una suspensión densa del cultivo puro en aproximadamente 0.2 ml de agua destilada y colocar un disco del reactivo o humedecer el disco con agua destilada, y luego colocar sobre el mismo una porción del cultivo puro con un ansa (no usar ansa de platino ni níquel). La reacción ocurre en forma inmediata, dentro de los 10 segundos (una reacción lenta se considera negativa)

Reacción positiva: coloración violeta

Reacción negativa: no hay cambio de coloración.

L-Lisina decarboxilasa: a partir del cultivo puro, inocular con una aguja de inoculación por debajo de la superficie del caldo. Incubar a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.

Reacción positiva: coloración violeta

Reacción negativa: coloración amarilla.

L-Ornitina decarboxilasa: a partir del cultivo puro, inocular con una aguja de inoculación por debajo de la superficie del caldo. Incubar a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.

Reacción positiva: coloración violeta

Reacción negativa: coloración amarilla.

L-Arginina dehidrolasa: a partir del cultivo puro, inocular con una aguja de inoculación por debajo de la superficie del caldo. Incubar a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.

Reacción positiva: coloración violeta

Reacción negativa: coloración amarilla.

Fermentación de azúcares: a partir del cultivo puro, inocular con una aguja de inoculación por debajo de la superficie del caldo. Incubar a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h ± 2 h.

Reacción positiva: coloración amarilla

Reacción negativa: coloración violeta.

Utilización de Citrato: a partir del cultivo puro, inocular con una aguja de inoculación por estría en la superficie inclinada del medio. Incubar a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 h ± 2 h.

Reacción positiva: cambio del color del medio del verde al azul.

3.3.5. Interpretación de los resultados de las pruebas bioquímicas

Test	Resultado	Porcentaje de cepas de <i>Enterobacter sakazakii</i> con el resultado indicado
Pigmentación amarilla en TSA	+	>99
Oxidasa	-	>99
L-Lisina decarboxilasa	-	>99
L-Ornitina decarboxilasa	+	± 90
L-Arginina dehidrolasa	+	>99
Utilización de citrato	+	>95
Fermentación de:		
D-Sorbitol	-	± 95
L-Ramnososa	+	>99
D-Sucrosa	+	>99
D-Melobiosa	+	>99
Amigdalina	+	>99

3.3.6. Control positivo

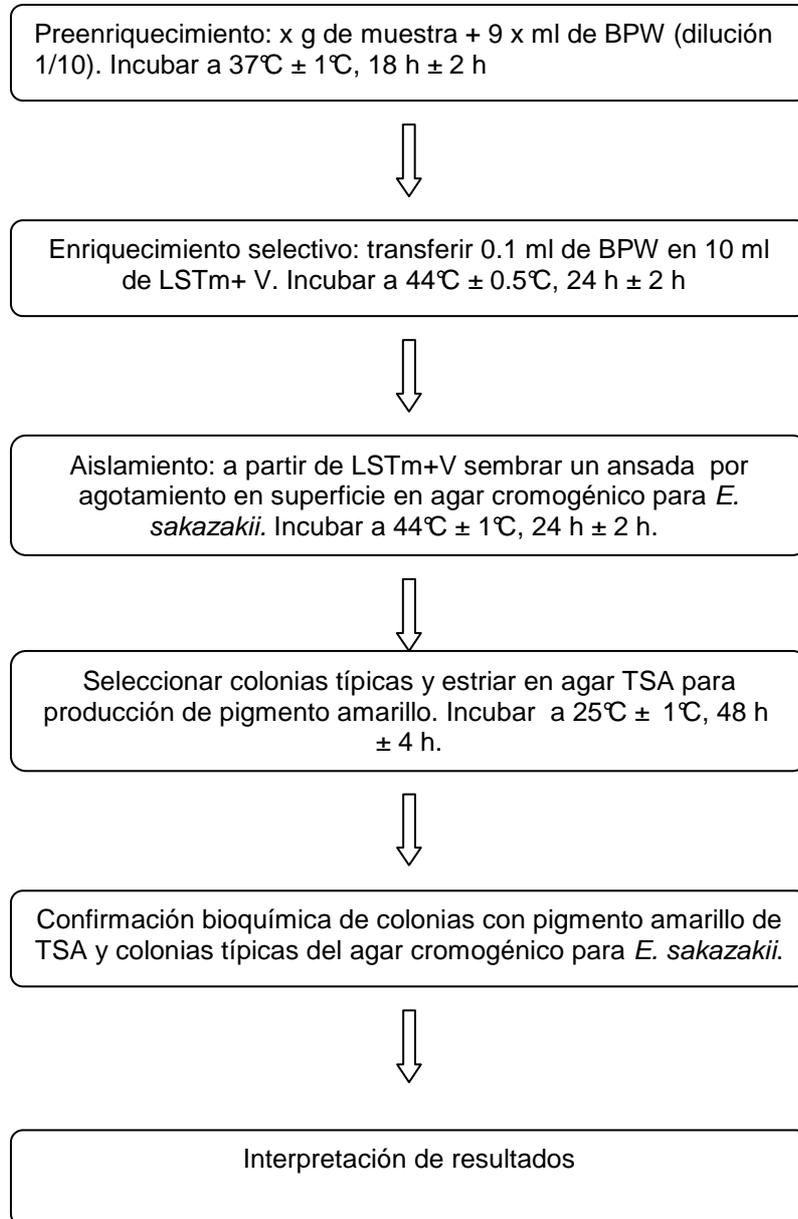
Junto con la muestra, sembrar un control positivo con un inóculo bajo de una cepa de *Enterobacter sakazakii* de referencia y proceder de la misma manera que la muestra para demostrar que el cultivo positivo es recuperado.

3.3.7. Expresión de los resultados

Se informa presencia o ausencia de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) en la porción de muestra analizada (por gramos o mililitros para muestras líquidas).

4. ANEXOS

ANEXO 1: Diagrama de flujo del procedimiento para la detección de *E. sakazakii* (*Cronobacter spp.*)



ANEXO 2: Medios de cultivos, propiedades bioquímicas y reactivos

1. Agua peptona bufferada (BPW)

Peptona (enzimática) de caseína	10.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Disodio hidrógeno fosfato dodecahidratado (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O)	9.0 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH ₂ PO ₄)	1.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua, si es necesario calentar. Ajustar el pH a 7.0 ± 0.2 a 25°C. Distribuir en frascos o tubos de acuerdo a las necesidades analíticas. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

2. Caldo lauril sulfato triptosa modificado + vancomicina (LSTm)

2.1 Caldo lauril sulfato triptosa modificado

Cloruro de sodio (NaCl)	34.0 g
Digesto enzimático de tejido animal y vegetal	20.0 g
Lactosa (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	5.0 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH ₂ PO ₄)	2.75 g
Dipotasio hidrógeno fosfato (K ₂ HPO ₄)	2.75 g
Lauril sulfato de sodio (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₅ S)	0.1 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua, si es necesario calentar. Ajustar el pH a 6.8 ± 0.2 a 25°C. Distribuir 10 ml de LSTm en tubos de 18 mm x 160mm. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

2.2 Solución de vancomicina

Vancomicina	10 mg
Agua destilada	10 ml

Disolver la vancomicina en agua destilada, mezclar y esterilizar por filtración. Conservar entre 0°C a 5°C hasta 15 días.

2.3 Caldo lauril sulfato triptosa modificado + vancomicina (LSTm)

Agregar 0.1 ml de la solución de vancomicina (2.2) a 10 ml del caldo LSTm (2.1) para obtener una concentración final de vancomicina de 10 µg por ml de LSTm. El medio completo de LSTm + vancomicina puede ser conservado entre 0°C a 5°C por un día.

3. Agar para aislamiento de *Enterobacter sakazakii* (ESIA)

Peptona (pancreática) de caseína	7.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
Desoxicolato de Sodio	0.6 g
5-Bromo-4-cloro-3-indol ó-D-glucopiranosido (C ₁₄ H ₁₅ BrCINO ₆)	0.15 g
Cristal Violeta	2 mg
Agar	12.0 a 18.0 g*
Agua destilada	1000 ml

*dependiendo de la fuerza gel del agar

Disolver los componentes en agua destilada llevando a ebullición. Ajustar el pH a 7.0 ± 0.2 a 25°C. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar entre 44°C y 47°C y agregar aproximadamente 15 ml de ESIA en pla cas de Petri. Dejar enfriar.

El medio puede ser conservado entre 0°C y 5°C hasta 14 días.

4. Triptona soja agar

Peptona de caseína	15.0 g
Peptona de soja	5.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Agar	12.0 a 18.0 g*
Agua destilada	1000 ml

*dependiendo de la fuerza gel del agar

Disolver los componentes en agua destilada llevando a ebullición. Ajustar el pH a 7.3 ± 0.2 a 25°C. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar entre 44°C y 47°C y agregar aproximadamente 15 ml de TSA en placas de Petri. Dejar enfriar.

5. Reactivo para el test de la Oxidasa

N, N, N', N'- tetrametil-p-fenilendiamina diclorohidrato (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ ·2HCl)	1.0 mg
Agua destilada	100 ml

Disolver los componentes en agua inmediatamente antes del uso

6. Medio para L-Lisina decarboxilasa

L-Lisina monoclorhidrato (C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ ·HCl)	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	1.0 g
Púrpura de bromocresol	0.015 g
Agua	1000 ml

Disolver los componentes en agua, calentando si es necesario. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 6.8 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Fraccionar 5 ml del medio en tubos de 18 mm x 160 mm. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

7. Medio para L – Ornitina decarboxilasa

L-Ornitina monoclorhidrato ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\cdot\text{HCl}$)	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	1.0 g
Púrpura de bromocresol	0.015 g
Agua	1000 ml

Disolver los componentes en agua, calentando si es necesario. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 6.8 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Fraccionar 5 ml del medio en tubos de 18 mm x 160 mm. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

8. Medio para L-Arginina dehidrolasa

L-Arginina monoclorhidrato ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\cdot\text{HCl}$)	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	1.0 g
Púrpura de bromocresol	0.015 g
Agua	1000 ml

Disolver los componentes en agua, calentando si es necesario. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 6.8 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Fraccionar 5 ml del medio en tubos de 18 mm x 160 mm. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

9. Medio para fermentación de hidratos de carbono

9.1 Medio base

Peptona de caseína	10.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Rojo fenol	0.02 g
Agua	1000 ml

Disolver los componentes en agua agitando si es necesario. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 6.8 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Fraccionar el medio en tubos y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

9.2 Solución de carbohidratos

(D-sorbitol, L-ramnosa, D-sucrosa, D-melobiosa o amigdalina)

Carbohidrato	8 g
Agua	100 ml

Para cada solución disolver el respectivo carbohidrato en agua y esterilizar por filtración.

9.3 Medio completo para fermentación de hidratos de carbono

Medio base (9.1)	875 ml
Solución de carbohidrato (9.2)	125 ml

Para cada carbohidrato agregar asépticamente la respectiva solución en el medio base. Fraccionar 10 ml del medio completo en tubos de 18 mm x 160 mm.

10. Medio citrato de Simmons

Citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	2.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Dipotasio hidrógeno fosfato (K_2HPO_4)	1.0 g
Amonio dihidrógeno fosfato ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)	1.0 g
Sulfato de magnesio (MgSO_4)	0.2 g
Azul de bromotimol	0.08 g
Agar	8.0 g a 18.0 g *
Agua destilada	1000 ml

*dependiendo de la fuerza gel del agar

Disolver los componentes en agua destilada llevando a ebullición. Ajustar el pH, si es necesario, para obtener un valor de 6.8 ± 0.2 a 25°C después de la esterilización. Fraccionar 10 ml del medio en tubos de 18 mm x 160 mm. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos .

Dejar los tubos tendidos para obtener agar en pico de flauta con un fondo de 2.5 cm de profundidad.

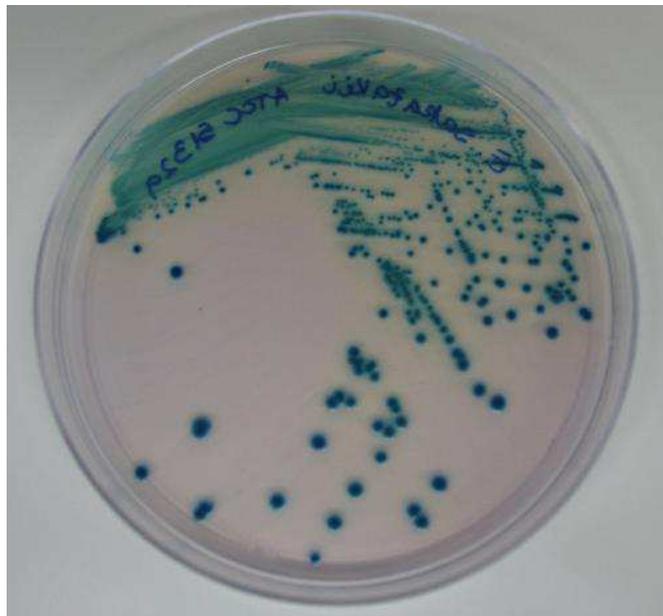
ANEXO 3: FOTOS

1. Agar TSA



Enterobacter sakazakii: colonias con pigmento amarillo.

2. Agar cromogénico



Enterobacter sakazakii: colonias típicas de tamaño mediano (1 a 3 mm), de color verde a verde azulado

5. REFERENCIAS

Technical Specification. ISO/TS 22964. IDF/RM 210. Milk and Milk Products - Detection of *Enterobacter sakazakii*. First edition 2006-02-0.