

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS

METODOLOGÍA ANALÍTICA OFICIAL

MICROORGANISMOS PATÓGENOS

VOLUMEN 2

**Este Manual ha sido preparado por integrantes del
Grupo Técnico de Microbiología de la RENALOA**

Redacción:

- Lic. María del Carmen Alcaide. Servicio de Microbiología, INAL - ANMAT
- Bioq. María Josefina Cabrera. Servicio de Microbiología, INAL – ANMAT

Revisión técnica

- Bioq. Mariela Darré. Dirección de Bromatología de la Provincia de Chaco
- Bioq. María Susana Condorí. Dirección de Bromatología de la Provincia de Tucumán
- Bioq. Marcela López. Laboratorio Regional de Salud Ambiental Cinco Saltos
- Lic. Verónica Trevisán. Departamento Laboratorio Microbiológico del Instituto Biológico "Dr Tomás Perón" de La Plata
- Med. Vet. Cecilia Peirano Departamento Laboratorio Microbiológico del Instituto Biológico "Dr Tomás Perón" de La Plata
- Lic. Stella Maris Reffi. Departamento Laboratorio Microbiológico del Instituto Biológico "Dr Tomás Perón" de La Plata
- Diana Verónica Benegas. Laboratorio Bromatológico Dr. G. Montes, Mercado de Abasto de Río Cuarto
- Lic. Nancy Passalacqua. CEPROCOR
- Med. Vet. María Noel Olivera. Servicio de Microbiología, INAL - ANMAT
- Lic. María Soledad Sarniguet. Servicio de Microbiología, INAL - ANMAT
- Lic. Fernando Trinks. Servicio de Microbiología, INAL - ANMAT

Revisión editorial y edición

- Lic. Martín Fernandez
- Lic. Juan Pablo Maseda
- Lic. Fernando Trinks

INDICE

<i>Bacillus cereus</i> en alimentos	pág. 5
Recuento de <i>Bacillus cereus</i> en muestras de alimentos. Técnica de recuento en placa. Procedimiento según International Standard Organization ISO 7932: 2006	pág. 11
<i>Bacillus cereus</i> . Detección y enumeración por la técnica de número más probable (NMP) en muestras de alimentos. Procedimiento según International Standard Organization ISO 21871:2006	pág. 30
<i>Clostridium perfringens</i> en alimentos	pág. 55
Recuento de <i>Clostridium perfringens</i> en muestras de alimentos. Técnica de recuento en placa. Procedimiento según International Standard Organization ISO 7937: 2004	pág. 62
<i>Staphylococcus aureus</i> en alimentos	pág. 85
Recuento de Estafilococos coagulasa positiva en muestras de alimentos. Técnica de recuento en placa. Procedimiento según International Standard Organization ISO 6888-1: 1999	pág. 91
Recuento de Estafilococos coagulasa positiva en muestras de alimentos. Técnica de recuento en placa. Procedimiento según International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)	pág. 109
Estafilococos coagulasa positiva. Detección y enumeración por la técnica de número más probable (NMP) en muestras de alimentos. Procedimiento según International Standard Organization ISO 6888- 3: 2003 (corrección 2004)	pág. 110
Estafilococos coagulasa positiva. Detección y enumeración por la técnica de número más probable (NMP) en muestras de alimentos. Procedimiento según International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)	pág. 134

Bacillus cereus



Bacillus cereus en alimentos

1. Generalidades

Bacillus cereus es un microorganismo Gram positivo, con forma de bastón, anaerobio facultativo y esporoformador. Por tinción de Gram se observan bacilos positivos grandes de extremos rectos, aislados, en pares o cadenas, la mayoría móvil por flagelos peritricos.

Las condiciones óptimas para su crecimiento son de 30°C a 40°C, con un rango de crecimiento entre 4°C y 55°C. Es mesófilo, pero existen cepas psicrótrofas.

El pH óptimo para el desarrollo es entre 6.0 y 7.0, con un mínimo de 5.0 y un máximo de 8.8.

La actividad acuosa (a_w) mínima para su desarrollo es 0.93 ⁽¹⁾.

La capacidad de esporular es una característica importante, porque estas estructuras confieren a la bacteria resistencia a condiciones adversas, de esta manera pueden seguir viables a pesar de que las células vegetativas hayan sido destruidas. Luego, si las condiciones son las apropiadas, la spora germina y el microorganismo puede crecer. La spora se desarrolla en forma central o subterminal sin deformación del esporangio. Para la germinación de las esporas, algunas cepas necesitan activación por calor (shock térmico), una opción es por calentamiento a 80°C durante 10 minutos. Esta propiedad es utilizada en algunas técnicas analíticas y es de importancia a la hora de establecer el origen de algunos brotes de ETA causados por este microorganismo.

Es resistente a la penicilina y más resistente que otros microorganismos esporulados al tratamiento con ácido peracético, el cual se usa como alternativa al peróxido de hidrógeno en el tratamiento de los envases para envasado aséptico de alimentos ⁽³⁾.

2. Taxonomía

Debido a la gran diversidad del género, la clasificación es compleja. Actualmente, la jerarquía taxonómica es: Reino: Bacteria; División: Firmicutes (bajo contenido G+C); Clase: Bacilli; Orden: *Bacillales*; Familia: *Bacillaceae*; Género: *Bacillus*; Subgrupo I: Grupo *Bacillus cereus sensu lato*. A este subgrupo también pertenecen: *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* ^(1, 2).

3. Características de la enfermedad

Es considerado un patógeno de riesgo moderado directo, de diseminación limitada, categoría 8 de la clasificación de la I.C.M.S.F. ⁽⁴⁾. La distribución del microorganismo es universal. Es una bacteria ubicua, encontrándose en suelo, polvo, ambiente, de fácil propagación a vegetales. También se ha encontrado en otros tipos de alimentos debido a contaminación cruzada. No se transmite de persona a persona, pero sí puede multiplicarse en el alimento. Se sabe que gran parte de los alimentos e ingredientes están contaminados con esta bacteria, pero no alcanzan la dosis infectiva, la cual es de aproximadamente 10^5 UFC/g ⁽⁵⁾. Se considera que un alimento que contenga más de 10^4 UFC/g de *B. cereus* podría no ser seguro para su consumo ⁽¹⁾.

La portación asintomática en el hombre tiene un rango del 13 al 43 % según la Organización Panamericana de la Salud ⁽⁶⁾, aunque algunos autores afirman que su presencia en heces refleja el consumo de alimentos contaminados, ya que la bacteria no colonizaría el intestino.

Bacillus cereus causa dos tipos de intoxicaciones, según la toxina involucrada: síndrome emético y síndrome diarreico. Según la cepa, producen una u otra toxina, pero hay algunas que tienen la capacidad de sintetizar las dos. El tipo de enfermedad predominante varía por regiones geográficas según la distribución de las cepas de *Bacillus cereus* y la dieta típica de cada zona.

El síndrome emético es ocasionado por una toxina preformada en el alimento ^(1, 7). La toxina involucrada es llamada cereulida o vomitoxina, es un péptido altamente resistente a los extremos de pH de 2 y 11, al calor (no se destruye por tratamiento a 121°C por 90 minutos) y a la acción de enzimas proteolíticas (tripsina y pepsina). Esta toxina es una molécula proteica pequeña, no antigénica, que se produce en la fase estacionaria de crecimiento, antes de la esporulación. Los síntomas se presentan entre una y cinco horas después de realizada la ingesta, predominando náuseas y vómitos. El malestar dura de 6 a 24 horas. Este cuadro puede confundirse con el ocasionado por *Staphylococcus aureus*. La toxina interfiere en la actividad mitocondrial y tiene acción inmunomoduladora. Esta toxina es la más peligrosa de las producidas por *Bacillus cereus*, junto con la citotoxina K.

El síndrome diarreico se debe a la germinación in vivo de las esporas de la bacteria en el intestino con la consecuente producción de enterotoxinas termolábiles. Suelen aparecer en alimentos mal refrigerados. Los síntomas aparecen entre las 6 y 8 horas de realizada la ingesta y duran entre 12 y 24 horas. La sintomatología principal consiste en diarrea y dolor abdominal y, ocasionalmente, náuseas y vómitos. Esta intoxicación suele confundirse con la

ocasionada por *Clostridium perfringens*. Las toxinas involucradas son moléculas proteicas que se elaboran en la fase exponencial de crecimiento de la bacteria, la toxicidad se pierde después de esta fase. Según Granum ⁽¹⁾, las enterotoxinas involucradas en intoxicaciones alimentarias son: citotoxina K1 y K2, enterotoxina no hemolítica (NHE) y, probablemente, hemolisina HBL. Hay otras dos enterotoxinas (T y FM) que se desconoce si son contaminantes de alimentos. La presencia de estas toxinas puede determinarse en el laboratorio por métodos moleculares (PCR) o por ensayos de citotoxicidad contra líneas celulares que resultaron ser sensibles a las enterotoxinas diarreicas, tales como Vero (células de riñón de mono) y CHO (células de ovario de hamster chino).

4. Epidemiología

Ambas intoxicaciones gastrointestinales tienen corto período de incubación (menos de 12 horas), son sintomáticas (principalmente diarrea, dolor abdominal, náuseas y vómito) y son autolimitadas, se resuelven en 12 a 24 horas sin necesidad de tratamiento con antimicrobianos. En la mayoría de los casos para el tratamiento alcanza con la hidratación adecuada del paciente durante el proceso.

Para confirmar un caso, es necesario identificar en el alimento sospechoso *Bacillus cereus* con un recuento igual o superior a 10^5 UFC/g; no es suficiente con su identificación en las heces debido a la posible portación asintomática. Además, hay que tener en cuenta en el caso del síndrome diarreico que la presencia de los genes de la toxina en cepas aisladas de *Bacillus cereus* no prueba la producción in vivo de la misma.

En general, se admite que debido a la levedad del cuadro y a que la detección de esta bacteria no se realiza rutinariamente en los análisis, la incidencia real puede ser mayor que la estimada. Además hay que tener en cuenta que el cuadro clínico puede confundirse con el causado por *Staphylococcus aureus* o *Clostridium perfringens*, según la toxina implicada.

La resistencia térmica de las esporas dificulta su eliminación del ambiente, relacionando su presencia con fallas en las condiciones higiénico sanitarias. Muchos alimentos están contaminados con *Bacillus cereus* debido a su amplia distribución en el ambiente, pero su presencia en pequeñas cantidades no suele constituir un problema ya que no causará enfermedad. Aquellos que son probable fuente de infección o intoxicación, son los que se conservan a temperatura ambiente luego de la cocción, lo cual puede permitir el desarrollo de la bacteria y la producción de toxina preformada en el alimento antes de su ingestión. Por lo tanto, si la cocción no fue suficiente para inactivar las células, es la falta de refrigeración inmediata del alimento lo que permitirá el desarrollo de dicha bacteria. Aunque

luego los alimentos se recalienten previamente a su consumo, este proceso no inactivará las esporas ni la toxina emética que pudo haberse producido. Por lo cual, la prevención de la enfermedad requiere del control de la germinación de las esporas y del crecimiento de las células vegetativas en los alimentos listos para consumir. Las condiciones que favorecen el desarrollo del microorganismo incluyen procedimientos que activan las esporas seguidos de un enfriamiento lento y el almacenamiento de los alimentos a temperaturas entre 10°C y 50°C. Para disminuir los riesgos de intoxicación, los alimentos deben ser refrigerados o consumidos en caliente, inmediatamente después de la cocción. La germinación de esporas también puede controlarse por regulación del pH y la a_w .

Alimentos amiláceos como el arroz, papas, pastas y otros están particularmente asociados a brotes por *Bacillus cereus*. También las especias son un importante vehículo de transmisión ya que las esporas son muy resistentes a la desecación. En productos cárnicos, la incidencia suele ser mayor debido a que en muchos de ellos se incorporan aditivos, como las especias, que incrementan el número de *Bacillus cereus*. La contaminación de leche con esta bacteria está muy relacionada a vacas enfermas con mastitis aguda. Alimentos que poseen leche en polvo en su composición pueden estar altamente contaminados con esporas, esto es especialmente importante en el desarrollo de fórmulas para lactantes y niños. Otros alimentos de los que fue aislada la bacteria son té, postres, legumbres, salsas, sopas, entre otros.

5. Determinación

Existen ciertas diferencias entre las normas que se utilizan para la determinación de *Bacillus cereus* en el laboratorio. Algunas normas establecen marchas para su determinación muy largas, con una extensa batería de pruebas bioquímicas. Por el contrario, hay otras que sólo indican la realización de algunas pocas pruebas debido a la dificultad de identificar a nivel especie las bacterias del género. Por este último camino se llega a una determinación "presuntiva" de *Bacillus cereus*. En estos casos, la determinación más importante se considera que es la capacidad hemolítica de la bacteria, ya que se relaciona esta propiedad con la patogenicidad de la misma (norma ISO 7932:2004).

6. Legislación

Actualmente, el C.A.A. exige su búsqueda en polvos o mezclas para preparar postres para helar (Art. 818 bis), en polvo para preparar helados, preparado básico para helados y similares (Art. 1079 bis),

en harinas de trigo (Art. 661 bis), en comidas preparadas listas para el consumo (Art. 156 tris) y en viandas a domicilio (Art. 151) ⁽⁸⁾

Por otro lado, la legislación de otros países pide su búsqueda en otros alimentos. Por ejemplo en España, hay límites establecidos para caldos, consomés, sopas y cremas; especias y condimentos; salsa de mesa; té; preparados para lactantes y alimentos dietéticos para menores de 6 meses.⁽⁹⁾ En Perú, se exige su búsqueda en muchos alimentos tales como: postres a base de helados, mezclas deshidratadas para helados, sopas, cremas, salsas y purés deshidratados instantáneos y que requieren cocción; en mezclas en seco de uso instantáneo (refrescos, gelatinas) y que requieren cocción (flanes); en harinas, almidones y féculas, cereales instantáneos, productos de panadería congelados listos para su consumo y en productos deshidratados e instantáneos que requieren reconstitución o cocción.⁽¹⁰⁾ En Chile, se pide su búsqueda en fórmulas lácteas, fórmulas para lactantes, mezclas deshidratadas de uso instantáneo o que requieran cocción, y en comidas y platos listos para el consumo que contengan arroz⁽¹¹⁾. La legislación brasileña también reglamenta su análisis en una amplia variedad de alimentos.⁽¹²⁾

Referencias

- (1) Granum, P. E. 2002 *Bacillus cereus*. En : Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. Doyle, M.P.; Bechaut, L. R.; Montville, T. J. A&M Press. Washington D.C. USA. Pág: 327 a 336.
- (2) Claus, D., Berkeley, R.C.W., 1986. Genus *Bacillus*. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. Pág: 1105-1139.
- (3) Blakistone, B. R. Chuyate, D. Kautter, jr., J. Charbonneau, and K. Suit. 1999. Efficacy of Oxonia Active against selected spore formers. J. Food Protect. 62: 262-7.
- (4) Microorganismos de los Alimentos. Características de los patógenos microbianos. ICMSF
- (5) Adams, M. R.; Moss, M. O. 1995. Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. USA. Pág. 160 a 164.
- (6) Diagnóstico e Investigación Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos. Organización Panamericana de la Salud. Curso virtual. <http://www.ops.org.ar/publicaciones/publicaciones20virtuales/libroETAs/index.html>
- (7) Rajkowski, K.T., Bennett, R.W., 2003. *Bacillus cereus*. En: International Handbook of foodborne Pathogens. Miliotis, M.D., Bier, J.W. Marcel Dekker, inc. New York, USA.
- (8) Código Alimentario Argentino. http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp
- (9) Reglamento (CE) N° 1441/2007. Diario Oficial de la Unión Europea. <http://cvu.rediris.es/pub/bscw.cgi/d311175/Normicro/Recopila/normicro.htm>
- (10) Norma sanitaria N° 071-MINSA/DIGESA-V.01, "Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano". Resolución ministerial N° 591-2008/MINSA. Perú.
- (11) Chile. Reglamento Sanitario de los Alimentos.
- (12) Resolución 2/1/2001. Reglamento técnico sobre patrones microbiológicos para alimentos. ANVISA, Ministerio de Salud, Brasil.
- (13) Rhodehamel, E.J; Harmon, S.M 1998. *Bacillus cereus*. En: Bacteriological Analytical Manual (BAM). Octava Edición, Revisión A.
- (14) Fundamento pruebas bioquímicas: Manual de Prácticas de Microbiología. Evangelina Olivas E. y Luis Roberto Alarcón. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.
- (15) Hobbs, B.C. and Gilbert, R. J. 1974. "Microbiological Counts in relation to food poisoning", Proceedings of the IV international Congress of Food Science Technology 3:159.

Recuento de *Bacillus cereus* en muestras de alimentos

Técnica de recuento en placa

Procedimiento según
International Standard Organization ISO 7932:2004

1. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar la enumeración de presunto *Bacillus cereus* viable por la técnica de recuento de colonias en placa a 30°C, en muestras de alimentos y muestras ambientales de las áreas de producción y manipulación de alimentos.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica para realizar la enumeración de presunto *Bacillus cereus* por la técnica de recuento de colonias en placa a 30°C en muestras de alimentos y muestras ambientales en el área de producción y manipulación de alimentos.

Con el fin de tener un método de ensayo práctico, la fase de confirmación ha sido restringida al aspecto típico de las colonias en agar MYP y al test de hemólisis.

El término "presunto" se utiliza con el fin de reconocer el hecho que la fase de confirmación no permite la distinción entre *B. cereus* y otras especies de *Bacillus* estrechamente relacionadas pero aisladas con menor frecuencia, tales como *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*.

En caso que se sospeche la presencia de *B. anthracis* se puede agregar un test de movilidad para ayudar a diferenciarlo de *B. cereus*.

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.

Normas de referencia: Para la aplicación del presente procedimiento son indispensables las normas citadas en el punto 5. "Referencias"

3. DESARROLLO

3.1. Definiciones

Para el propósito de este documento, presunto *Bacillus cereus* es una bacteria que forma colonias típicas en la superficie del medio de cultivo selectivo y da una reacción positiva de confirmación bajo las condiciones especificadas en este procedimiento.

Al parecer muchas, si no la mayoría, de las cepas de *Bacillus cereus* germinan rápidamente en la superficie del medio de cultivo usado para recuento. En la mayoría de los casos no parece ser necesario un shock térmico para provocar la germinación. A veces un tratamiento térmico es deseable, por ejemplo para el recuento de esporas o para inhibir el crecimiento de células vegetativas. En tales casos se recomienda un calentamiento por 10 minutos a 80°C.

3.2. Medios de cultivo, reactivos, materiales y equipos

- 3.2.1. Agua peptona bufferada (BPW)
- 3.2.2. Solución salina peptonada (SFP)
- 3.2.3. Agar manitol yema de huevo polimixina (MYP) para aislamiento de *Bacillus cereus*
- 3.2.4. Solución de polimixina (10⁶ U.I. en 100 ml)
- 3.2.5. Emulsión de yema de huevo
- 3.2.6. Agar base sangre
- 3.2.7. Sangre de oveja desfibrinada
- 3.2.8. Estufa de esterilización
- 3.2.9. Autoclave
- 3.2.10. Estufa de incubación: 30°C ± 1°C
- 3.2.11. Baño de agua o aparato similar capaz de mantener la temperatura a 45°C ± 0.5°C y a 50°C ± 1°C,
- 3.2.12. Peachímetro de exactitud 0.01 a 25°C ± 1°C.
- 3.2.13. Pipetas de 1 ml y 10 ml de capacidad, graduadas en intervalos de 0.1 y 0.5 ml respectivamente
- 3.2.14. Ansas de platino/iridio o níquel/cromo de aproximadamente 3 mm de diámetro y de punción del mismo material, o equivalentes estériles descartables.
- 3.2.15. Tubos de ensayo, botellas o frascos de capacidad apropiada, en particular de 16 mm x 160 mm o bolsas de plásticos estériles de capacidad apropiada.
- 3.2.16. Equipo para mezclado (tipo stomacher)
- 3.2.17. Agitador mecánico (tipo vortex)
- 3.2.18. Placas de Petri de vidrio o plástico de 90 a 100 mm de diámetro o de 140 mm en caso que fuere necesario.
- 3.2.19. Espátula de Drigalsky
- 3.2.20. Equipo de filtración para esterilización de soluciones.

3.3. Principio (ver anexo 1)

El método está basado en las siguientes etapas:

3.3.1. Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones decimales sucesivas.

3.3.2. Plaqueo en la superficie de un medio de cultivo selectivo de una cantidad específica de la muestra problema si es líquida o de la suspensión inicial si es sólida y de las diluciones decimales sucesivas. Incubación en aerobiosis a 30°C por 18 h a 48 h.

3.3.3. Cálculo del número de presunto *Bacillus cereus* por gramo o mililitro de muestra a partir del número de colonias obtenidas de las placas que dan resultados significativos y de la confirmación de acuerdo al test especificado.

3.4. Muestreo

El plan de muestreo a utilizar está fuera del alcance de esta metodología.

3.5. Procedimiento

3.5.1. Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones (ISO 6887-1:1999)

NOTA: Para este punto referir a la norma ISO 6887 – 1 y las normas específicas para el alimento en cuestión. (Ver punto 5 “Referencias”)

3.5.1.1. Suspensión inicial

En un frasco estéril o bolsa de plástico estéril pesar con una incertidumbre de medición de $\pm 5\%$ una cantidad de masa x g o medir con una incertidumbre de medición de $\pm 5\%$ un volumen x ml (como mínimo 10 g ó 10 ml a menos que se indique otra cantidad).

Agregar una cantidad del diluyente igual a $9x$ g ó $9x$ ml (dilución 1/10) y homogeneizar de 1 a 3 minutos dependiendo del alimento.

Para evitar daños de los microorganismos por cambios bruscos de temperatura, la temperatura del diluyente debería ser aproximada a la temperatura ambiente.

En el caso de recuento de esporas realizar un tratamiento térmico a la suspensión inicial, inmediatamente después de su preparación, por ejemplo 10 minutos a 80°C seguido de un enfriamiento rápido.

NOTA: En algunos casos, particularmente para los productos muy viscosos o muy espesos, podría ser necesario agregar mayor cantidad de diluyente lo cual debe tenerse en cuenta en las operaciones subsiguientes y / o en la expresión de resultados.

3.5.1.2. Diluciones decimales

Transferir con una pipeta 1ml (con una incertidumbre de medición de $\pm 5\%$) de la suspensión inicial en un tubo con 9 ml del diluyente estéril, para obtener la dilución 10^{-2} .

Para una óptima precisión no introducir la pipeta más de 1 cm en la suspensión inicial y evitar el contacto entre la pipeta que contiene el inóculo y el diluyente estéril.

Mezclar utilizando preferentemente un agitador mecánico entre 5 y 10 segundos. Si es necesario repetir esta operación a partir de la dilución 10^{-2} y diluciones sucesivas, utilizando en cada operación una nueva pipeta estéril para obtener las siguientes diluciones (10^{-3} , 10^{-4} , etc.). Se realizan las diluciones que sean necesarias para obtener un número apropiado de microorganismos para realizar el recuento. (Ver 3.5.3.)

3.5.1.3. Duración del procedimiento

El tiempo transcurrido entre el final de la preparación de la suspensión inicial y el instante en que el inóculo entra en contacto con el medio de cultivo no debe superar los 45 minutos, mientras que el lapso de tiempo límite entre la preparación de la suspensión inicial y el comienzo de la preparación de las diluciones decimales sucesivas es de 30 minutos.

NOTA: si la temperatura ambiente del laboratorio es muy alta estos dos lapsos de tiempo deben ser reducidos.

3.5.2. Inoculación e incubación

3.5.2.1. Transferir por medio de una pipeta estéril, 0.1 ml de la muestra si el producto es líquido ó 0.1 ml de la suspensión inicial (dilución 1/10), por duplicado, a placas de agar MYP. Si es necesario repetir el procedimiento para las sucesivas diluciones decimales.

3.5.2.2. Para algunos productos se puede aumentar el límite de detección por un factor de diez, examinando 1 ml de la muestra inicial si es líquida ó 1 ml de la suspensión inicial para otros productos. Distribuir 1 ml del inóculo en la superficie de una placa de Petri de 140 mm de diámetro con agar MYP o en tres de placas 90 mm de diámetro con agar MYP utilizando una espátula de Drigalsky. En ambos casos preparar duplicados usando dos placas de 140 mm o seis placas de 90 mm.

3.5.2.3. Distribuir el inóculo tan pronto como sea posible sobre la superficie del medio sin tocar los bordes de las placas con una espátula estéril. Utilizar una espátula para cada placa. Dejar las placas con la tapa puesta por 15 minutos a temperatura ambiente para permitir que el inóculo sea absorbido en el agar.

3.5.2.4. Invertir las placas e incubarlas a 30°C entre 18 y 24 horas. Si no hay colonias claramente visibles, incubar las placas por 24 horas adicionales antes del conteo.

3.5.3. Recuento y selección de las colonias

Después de la incubación por el período especificado, seleccionar las placas, preferiblemente en dos diluciones sucesivas, en las que el

recuento sea menor a 150 colonias, contar en cada placa las colonias con características de colonias presuntas de *Bacillus cereus*.

Las colonias presuntas son grandes, rosas (indicando que no ocurre fermentación del manitol, ver NOTA 1) y generalmente rodeadas de una zona de precipitación (producción de lecitinasa, ver NOTA 2).

Si hay menos de 15 colonias características en las placas inoculadas con el producto líquido o con la menor dilución de los otros productos, es posible realizar un recuento estimado como se indica en el punto 3.5.5.

NOTA 1. Si las placas contienen numerosos organismos fermentadores de manitol que producen ácido, la característica de color rosa de las colonias de *Bacillus cereus* puede reducirse o desaparecer por completo.

NOTA 2. Algunas cepas de *Bacillus cereus* producen poco o nada de lecitinasa. Las colonias deberían también ser sometidas al test de confirmación.

Si el inóculo de 1 ml fue distribuido sobre tres placas de Petri de 90 mm (ver 3.5.2.2) tratar esas placas como una en el recuento y en el procedimiento de confirmación.

3.5.4. Confirmación

3.5.4.1. Selección y purificación de las colonias para confirmación

Elegir cinco colonias presuntas de cada placa seleccionada como en 3.5.3. Si hay menos de cinco colonias en la placa, tomar todas las colonias presentes. Confirmar esas colonias como se especifica en 3.5.4.2 y 3.5.4.3

Si las placas están con sobrecrecimiento y no es posible seleccionar colonias bien aisladas, estriar 5 colonias presuntivas en placas con el medio selectivo (MYP). Incubar las placas a 30°C durante 18 h a 24 h.

Seleccionar de cada placa al menos una colonia bien aislada. Confirmar como se especifica en 3.5.4.2 y 3.5.4.3.

3.5.4.2. Confirmación por el test de hemólisis en agar sangre de oveja

Estriar, pinchar o sembrar como mancha las colonias seleccionadas en 3.5.4.1 a partir de las placas de MYP en la superficie de agar sangre de oveja de modo de obtener colonias aisladas que permitan una buena interpretación de la reacción de hemólisis.

Incubar a 30°C durante 24 h y leer la reacción de hemólisis.

Cada colonia rodeada de una zona clara se considera hemólisis positiva.

3.5.4.3. Interpretación bioquímica

Ver tabla 1

Tabla 1

Test	Resultado de los test
Agar MYP	Formación de colonia rosa rodeada de precipitado (ver NOTA 1 en 3.5.3.)
Hemólisis	Reacción positiva (a)

(a) El ancho de la zona de hemólisis puede variar

3.5.5. Expresión de los resultados

3.5.5.1. Recuento de colonias de presunto *Bacillus cereus*

Informar el recuento de presunto *Bacillus cereus* en la porción de muestra analizada (por gramos o mililitros para muestras líquidas). Ver Anexo 3: Cálculo y expresión de resultados.

3.5.5.2. Placas sin colonias

Si las dos placas correspondientes a la muestra sembrada (productos líquidos) o a la suspensión inicial (otros productos) no contienen colonias de presunto *Bacillus cereus* informar el resultado como sigue:

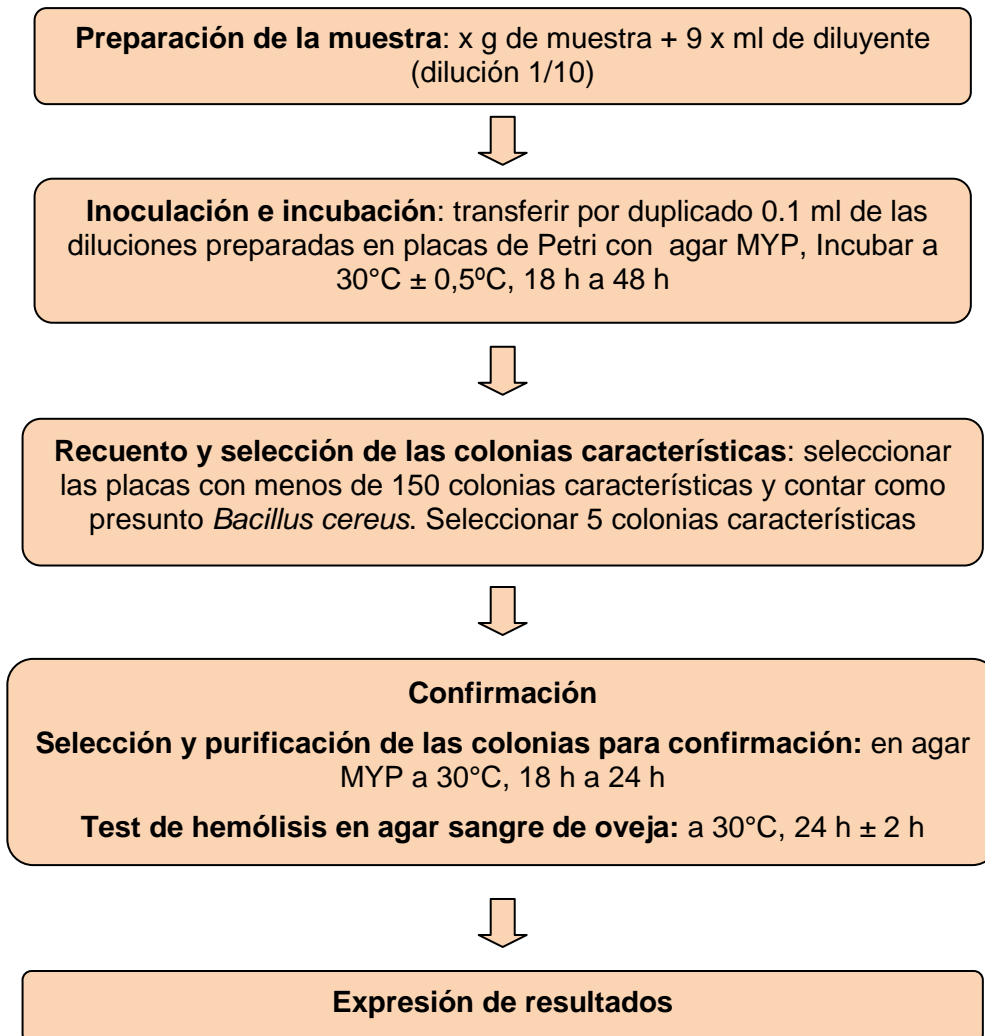
Si se sembró 1 ml repartido en 3 placas (ver 3.5.2.2)

- Menos de 1 microorganismo / ml (productos líquidos) ó
- Menos de 1/d microorganismo / g (otros productos) donde d es el factor de dilución de la suspensión inicial.

Si se sembró 0.1 ml en cada placa

- Menos de 10 microorganismos / ml (productos líquidos) ó
- Menos de 10/d microorganismos / g (otros productos) donde d es el factor de dilución de la suspensión inicial.

4. ANEXOS

ANEXO 1: Diagrama de flujo del procedimiento para recuento de *Bacillus cereus*

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. Solución salina peptonada (SFP)

Digesto enzimático de caseína	1.0 g
Cloruro de sodio	8.5 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.

3. Agar manitol yema de huevo polimixina (MYP)

3.1. Medio base

Digesto enzimático de caseína	10.0 g
Extracto de carne	1.0 g
D- manitol	10.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	10.0 g
Rojo fenol	0.025 g
Agar	9 g a 18 g*
Agua destilada	900 ml

*dependiendo de la firmeza del agar

Disolver los componentes en agua, por calentamiento y agitación. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor después de la esterilización de 7.2 ± 0.2 a 25°C . Fraccionar 90 ml del medio en recipientes de capacidad adecuada. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

3.2. Solución de sulfato de polimixina B

Sulfato de polimixina B	1.000.000 unidades (equivalente a 0.1g aproximadamente)
Agua destilada	100 ml

Disolver el sulfato de polimixina B en agua destilada. Esterilizar por filtración.

3.3 Emulsión de yema de huevo.

Usar huevos de gallina frescos, limpios y con sus cáscaras intactas. Lavar los huevos, usando un cepillo, en detergente líquido. Enjuagar bajo agua corriente, sumergir por 30 segundos en alcohol 70% en volumen y secar. Usando procedimientos asépticos, romper cada huevo y separar la yema de la clara por repetidas transferencias de la yema de una mitad de la cáscara del huevo a la otra. Poner las yemas en un recipiente con graduación y agregar cuatro partes en volumen de agua estéril. Transferir asépticamente a un recipiente estéril y mezclar vigorosamente.

Calentar la mezcla durante 2 h en baño de agua a 44°C - 47°C. Luego dejar durante 18 h a 24 h a 3°C ± 2°C para permitir que se forme un precipitado.

Recoger el sobrenadante asépticamente.

La emulsión puede ser guardada a 3°C ± 2°C durante no más de 72 h.

NOTA: Se acordó incluir en este procedimiento la siguiente modificación a la Norma ISO 7932:2006.

Con el objetivo de aumentar la practicidad de la técnica se incluyen en este procedimiento dos opciones de Emulsión de yema de huevo

1. En caso de haber disponible se puede utilizar una preparación comercial
2. Como opcional se puede utilizar el procedimiento del Bacteriological Analytical Manual para la preparación de la emulsión yema de huevo

Emulsión de yema de huevo al 50%: Bacteriological Analytical Manual M51

(<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064304.htm>)

Lavar los huevos frescos con un cepillo duro y enjuagar bajo corriente de agua, sumergir por 1 h en etanol al 70% y escurrir. Usando procedimientos asépticos, romper cada huevo y separar la yema de la clara por repetidas transferencias de la yema de una mitad de la

cáscara del huevo a la otra. Retirar las yemas de huevo con una jeringa estéril o una pipeta de boca ancha. Colocar las yemas en un recipiente estéril y mezclar asépticamente con un volumen igual de solución salina estéril 0,85%. Almacenar a 4°C hasta su uso. La yema de huevo emulsión (50%) está disponible comercialmente.

3.4 Medio completo

Medio base (3.1)	90.0 ml
Solución de sulfato de polimixina (3.2)	1.0 ml
Emulsión yema de huevo (3.3)	10.0 ml

Fundir el agar base y enfriar en baño de agua a 44°C - 47°C.
 Agregar los otros ingredientes agitando continuamente.
 Mantener en baño de agua a 44°C - 47°C.

Preparación de las placas de Petri

Transferir 15 a 20 ml del medio completo en placas de Petri y dejar solidificar. Las placas pueden guardarse a 3°C ± 2°C hasta 4 días. Antes de ser usadas, secar las placas en estufa entre 25°C y 50°C, preferentemente sin la tapa y con la superficie del agar hacia abajo hasta que la misma esté seca.

4. Agar sangre de oveja

4.1 Medio base sangre N° 2

Proteasa peptona o peptona equivalente	15.0 g
Hidrolizado de hígado	2.5 g
Extracto de levadura	2.5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Agar	12g a 18g*
Agua destilada	1000 ml

*dependiendo de la fuerza gel del agar

Disolver los componentes o el medio deshidratado en agua, por ebullición. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor después de la esterilización de 7.3 ± 0.2 a 25°C. Fraccionar en recipientes de capacidad adecuada. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

4.2 Sangre de oveja desfibrinada

4.3 Medio completo

Medio base (4.1)	100 ml
Sangre de oveja desfibrinada	5 ml a 7 ml

Fundir el agar base y enfriar en baño de agua a 47°C. Agregar la sangre desfibrinada. Mezclar.

Verter aproximadamente al menos 12 ml del medio en placas de Petri estériles y dejar solidificar.

ANEXO 3: Cálculo y expresión de los resultados (ISO 7218:2007)

NOTA: Para el cálculo y expresión de resultados se seguirán los requisitos generales establecidos en la Norma ISO 7218 salvo que la norma ISO 7932 para recuento de *Bacillus cereus* en placa indique otros requisitos específicos.

1. Método de cálculo

Para que un resultado sea válido, se suele considerar necesario que el recuento de colonias se realice al menos en una placa que contenga un mínimo de 15 colonias sospechosas (de acuerdo a la norma específica ISO 7932 para recuento de *Bacillus cereus* en placa)

2. Método de cálculo después de la confirmación

2.1. En este método donde se requiere de una confirmación para el recuento, se identifica un número de colonias sospechosas (A) que se someten a confirmación (ver 3.5.4.1). Tras la confirmación se calcula el número de colonias de cada placa (a) que cumplen con los criterios de la confirmación, utilizando la ecuación (1):

$$1. \quad a = \frac{b}{A} \times C$$

Donde:

- b : es el número de colonias que cumplen con los criterios de confirmación dentro de las colonias sospechosas A que se someten a confirmación
- C : es el número total de colonias sospechosas contadas en cada placa

2.2. El resultado calculado se aproxima al número entero más próximo. Cuando se realiza esta operación, si la primera cifra decimal es inferior a 5, no se modifica la cifra anterior; si la primera cifra decimal es igual o superior a 5, la cifra anterior se incrementa en una unidad

2.3. El número de microorganismos N presentes en la muestra de análisis se calcula reemplazando ΣC por Σa en la ecuación general

$$N = \frac{\Sigma C}{V \times 1,1 \times d} \quad \text{quedando} \quad N = \frac{\Sigma a}{V \times 1,1 \times d}$$

Donde:

V : es el volumen de inóculo utilizado en cada placa, en mililitros

- d : es la dilución correspondiente a la primera dilución elegida ($d = 1$ cuando se utiliza el producto líquido sin diluir)

2.4. El resultado calculado se redondea a dos cifras significativas. Cuando se realiza esta operación, si la tercera cifra es inferior a 5, no se modifica la cifra anterior; si la tercera cifra es igual o superior a 5, la cifra anterior se incrementa en una unidad.

Preferiblemente el resultado se expresa como un número entre 1.0 y 9.9 multiplicado por la potencia de 10 adecuada, o como un número entero con dos cifras significativas.

El resultado se expresa como número de microorganismos N por mililitro (para productos líquidos) o por gramo (para el resto de productos)

EJEMPLO: El recuento ha proporcionado los siguientes resultados

- Para la primera dilución escogida (10^{-3}): 66 colonias
- Para la segunda dilución escogida (10^{-4}): 4 colonias

Realizando el análisis de las colonias escogidas:

- de las 66 colonias, se analizaron 8, de las que 6 cumplieron los criterios, por consiguiente $a = 50$
- de las 4 colonias, las 4 cumplieron los criterios; por consiguiente $a = 4$

$$N = \frac{\sum a}{V \times 1,1 \times d} = \frac{50 + 4}{1 \times 1,1 \times 10^{-3}} = \frac{54}{1,1 \times 10^{-3}} = 49090$$

Redondeando el resultado como se indicó en 2.4., el número de microorganismos es de 49000 o $4,9 \times 10^4$ por mililitro o por gramo de producto.

NOTA: en caso de sembrar 0.1 ml $V = 0.1$ ml

3. Método de cálculo para recuento bajo

3.1. Si la placa contiene menos de 15 colonias (de acuerdo a la norma específica ISO 7932 para recuento de *Bacillus cereus* en placa), pero como mínimo 4, el resultado se calcula como lo indicado en 2.3 y se expresa como número estimado de microorganismos x por mililitro (productos líquidos) o por gramo (resto de productos)

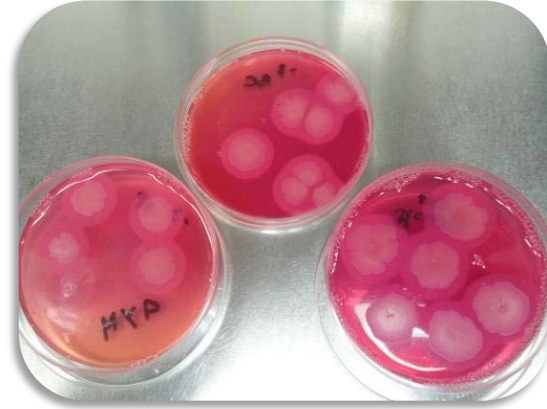
3.2. Si el resultado total oscila entre 1 y 3 colonias, la precisión del análisis es demasiado baja y el resultado debe expresarse como:

“Hay microorganismos presentes, pero a un nivel inferior a $(4 \times d)$ por gramo o ml”

NOTA: para recuentos de casos especiales ver la norma ISO 7218:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs. General requirements and guidance for microbiological examinations.

ANEXO 4: FOTOS

1. Agar manitol yema de huevo polimixina (MYP)



Bacillus cereus ATCC 4778: colonias típicas rosa rodeada de precipitado

2. Agar sangre de oveja



Bacillus cereus: reacción positiva para el test de hemólisis

5. REFERENCIAS

(1) International Standard. ISO 7932: 2004 (E). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus*. Colony - count technique at 30°C. Third edition, 2004-06-15.

(2) International Standard. ISO 6887 – 1. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. First edition, 1999-02-15.

(3) International Standard. ISO 7218: 2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs. General requirements and guidance for microbiological examinations. Third edition, 2007-08-15.

NOTA: Las siguientes normas de referencias son indispensables para la aplicación del presente procedimiento. Para cada norma de referencia debe aplicarse la edición citada, en caso de no especificarse la misma, deberá aplicarse la última edición (incluyendo cualquier modificación).

ISO 6887-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

ISO 6887-2, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products

ISO 6887-3, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products

ISO 6887-4, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products meat and meat products, and fish and fishery products

ISO 7218, Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations.

ISO 6887-5, Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products

ISO/TS 11133-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 1 : General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory

ISO/TS 11133-2:2003, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media

Bacillus cereus

Detección y enumeración por la técnica de número más probable (NMP) en muestras de alimentos

Procedimiento según
International Standard Organization ISO 21871:2006

1. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar la detección y la enumeración de presunto *Bacillus cereus* viable, en bajo número, por la técnica de número más probable (NMP) y método de detección en muestras de alimentos y muestras ambientales de las áreas de producción y manipulación de alimentos.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica para realizar la detección y la enumeración de presuntos *Bacillus cereus* en bajo número por la técnica de número más probable (NMP) y método de detección en alimentos y muestras ambientales en el área de producción y manipulación de alimentos.

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.

Normas de referencia: Para la aplicación del presente procedimiento son indispensables las normas citadas en el punto 5. "Referencias"

3. DESARROLLO

3.1. Definiciones

Para el propósito de este documento, presunto *Bacillus cereus* es una bacteria que forma colonias típicas o atípicas en la superficie del medio de cultivo selectivo, y da reacciones positivas de confirmación bajo las condiciones especificadas en este procedimiento.

NOTA: La definición de presunto *Bacillus cereus* obedece al hecho de que para propósitos prácticos este procedimiento no distingue entre otras especies íntimamente relacionadas. En particular el test de confirmación no es adecuado para distinguir entre *Bacillus cereus* y otras especies de *Bacillus* como *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides* and *Bacillus pseudomycoides*

3.2. Principio (ver anexo 1)

3.2.1. Método de enumeración

El método está basado en las siguientes etapas:

3.2.1.1. Inoculación de tres tubos con medio líquido de enriquecimiento selectivo doble concentración, con una cantidad específica de la primera dilución (suspensión inicial).

3.2.1.2. Inoculación de tres tubos con medio líquido de enriquecimiento selectivo simple concentración, con una cantidad específica de la primera dilución (suspensión inicial). Luego bajo las mismas condiciones inoculación de tres tubos con medio líquido de enriquecimiento selectivo simple concentración, con una cantidad específica de las diluciones sucesivas realizadas a partir de la suspensión inicial.

3.2.1.3. Incubación de los tubos con medio líquido de enriquecimiento selectivo simple y doble concentración a 30°C durante 48 h.

3.2.1.4. Inoculación en superficie del medio de cultivo sólido selectivo a partir de los tubos con medio líquido de enriquecimiento selectivo.

3.2.1.5 Incubación de las placas a 37°C ó 30°C (de acuerdo al medio sólido selectivo utilizado) durante 18 h a 48 h y selección de colonias típicas de presuntos *Bacillus cereus*.

3.2.1.6. Confirmación de las colonias típicas por el test de hemólisis y por observación microscópica.

3.2.1.7. Cálculo del NMP de presunto *Bacillus cereus* por gramo o por mililitro de muestra, teniendo en cuenta los tubos confirmados y utilizando la tabla de NMP.

3.2.2. Método de detección

El método está basado en las siguientes etapas:

3.2.2.1. Inoculación de un medio de enriquecimiento selectivo con una cantidad específica de la muestra si el producto es líquido o con una cantidad específica de la dilución inicial en caso de otros productos.

3.2.2.2. Incubación del tubo a 30°C durante 48 h.

3.2.2.3. Inoculación por superficie del medio de cultivo sólido selectivo a partir del medio líquido de enriquecimiento selectivo.

- 3.2.2.4. Incubación de las placas a 37°C ó 30°C durante 18 h a 48 h y selección de colonias típicas de presunto *Bacillus cereus*
- 3.2.2.5. Confirmación de las colonias típicas por el test de hemólisis y por observación microscópica
- 3.2.2.6. Expresión de resultados como “presencia” o “ausencia” de presuntos *Bacillus cereus* en g o ml de producto.

3.3. Medios de cultivo, soluciones, reactivos para propiedades bioquímicas y equipos (ver ANEXO 2)

- 3.3.1. Agua peptona bufferada (BPW).
- 3.3.2. Solución salina peptonada (SFP).
- 3.3.3. Medio selectivo líquido: caldo triptona soja polimixina (TSPB).
- 3.3.4. Medio selectivo sólido: agar polimixina piruvato emulsión de yema de huevo manitol azul de bromotimol (PEMBA).
- 3.3.5. Solución de sulfato de polimixina B.
- 3.3.6. Emulsión de huevo.
- 3.3.7. Medio selectivo sólido: agar manitol yema de huevo polimixina (MYP)
- 3.3.8. Solución de verde de malaquita.
- 3.3.9. Solución de Sudan black B.
- 3.3.10. Xileno.
- 3.3.11. Solución de safranina.
- 3.3.12. Agar base sangre.
- 3.3.13. Sangre de oveja desfibrinada.
- 3.3.14. Estufa de esterilización
- 3.3.15. Autoclave
- 3.3.16. Estufa de incubación: a 30°C ± 1°C o 37°C ± 1°C
- 3.3.17. Baño de agua o aparato similar capaz de mantener la temperatura a 47°C ± 2°C y aproximadamente 80°C
- 3.3.18. Peachímetro de exactitud 0.01 a 25°C ± 1°C.
- 3.3.19. Pipetas de 10 ml y 1 ml de capacidad, graduadas en intervalos de 0.5 ml y 0.1 ml respectivamente.
- 3.3.20. Ansas de platino-iridio o níquel-cromo de aproximadamente 3 mm de diámetro y de punción del mismo material, o equivalentes estériles descartables.
- 3.3.21. Tubos de ensayo, botellas o frascos de capacidad apropiada, en particular de 16 mm x 160 mm y tubos de hemólisis.
- 3.3.22. Placas de Petri de vidrio o plástico de 90 mm a 100 mm de diámetro.
- 3.3.23. Vortex
- 3.3.24. Mezclador tipo stomacher
- 3.3.25. Microscopio con objetivo de inmersión
- 3.3.26. Portaobjetos de aproximadamente 76 mm por 26 mm
- 3.3.27. Papel de filtro de poro fino, por ejemplo Whatman N° 41

3.4. Muestreo

El plan de muestreo a utilizar está fuera del alcance de esta metodología.

3.5. Procedimiento

3.5.1. Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones (ISO 6887-1:1999)

NOTA: Para este punto referir a la norma ISO 6887 – 1 y las normas específicas para el alimento en cuestión. (Ver punto 5. Referencias)

3.5.1.1. Suspensión inicial

En un frasco estéril o bolsa de plástico estéril pesar con una incertidumbre de medición de $\pm 5\%$ una cantidad de masa x g o medir con una incertidumbre de medición de $\pm 5\%$ un volumen x ml (como mínimo 10 g ó 10 ml a menos que se indique otra cantidad).

Agregar una cantidad del diluyente igual a $9x$ g ó $9x$ ml (dilución 1/10) y homogeneizar de 1 a 3 minutos dependiendo del alimento.

Para evitar daños de los microorganismos por cambios bruscos de temperatura, la temperatura del diluyente debería ser aproximada a la temperatura ambiente.

En el caso de recuento de esporas realizar un tratamiento térmico a la suspensión inicial, inmediatamente después de su preparación, por ejemplo 10 minutos a 80°C seguido de un enfriamiento rápido.

NOTA: En algunos casos, particularmente para los productos muy viscosos o muy espesos, podría ser necesario agregar mayor cantidad de diluyente lo cual debe tenerse en cuenta en las operaciones subsiguientes y / o en la expresión de resultados.

3.5.1.2. Diluciones decimales

Transferir con una pipeta 1ml (con una incertidumbre de medición de $\pm 5\%$) de la suspensión inicial en un tubo con 9 ml del diluyente estéril.

Para una óptima precisión no introducir la pipeta más de 1 cm en la suspensión inicial y evitar el contacto entre la pipeta que contiene el inóculo y el diluyente estéril.

Mezclar utilizando preferentemente un agitador mecánico de 5 a 10 segundos para obtener la dilución 10^{-2} .

Si es necesario repetir esta operación a partir de la dilución 10^{-2} y diluciones sucesivas, utilizando en cada operación una nueva pipeta estéril para obtener las siguientes diluciones (10^{-3} , 10^{-4} , etc.). Se realizan las diluciones que sean necesarias para obtener un número apropiado de microorganismos para realizar el recuento. (Ver 3.5.3.)

3.5.1.3. Duración del procedimiento

El tiempo transcurrido entre el final de la preparación de la suspensión inicial y el instante en que el inóculo entra en contacto

con el medio de cultivo no debe superar los 45 minutos, mientras que el lapso de tiempo límite entre la preparación de la suspensión inicial y el comienzo de la preparación de las diluciones decimales sucesivas es de 30 minutos.

NOTA: si la temperatura ambiente del laboratorio es muy alta estos dos lapsos de tiempo deben ser reducidos.

3.5.2. Inoculación e incubación

3.5.2.2. Método de enumeración

3.5.2.2.1. Porción de muestra para el ensayo y suspensión inicial

Preparar la suspensión inicial y las diluciones decimales de acuerdo al ítem 3.5.1.

3.5.2.2.2. Inoculación e incubación

Inocular 3 tubos que contengan caldo triptona soja polimixina (TSPB) doble concentración, con 10 ml de la primera dilución (suspensión inicial) y mezclar utilizando un agitador tipo vortex. Esta inoculación equivale a 1 g de muestra por tubo.

Inocular 3 tubos que contengan caldo triptona soja polimixina (TSPB) simple concentración, con 1 ml de la primera dilución (suspensión inicial) (equivale a 0.1 g de la muestra por tubo) y mezclar utilizando un agitador tipo vortex.

Para cada dilución decimal sucesiva transferir 1 ml a 3 tubos con medio TSPB simple concentración.

Incubar los tubos inoculados a 30°C durante 48 h ± 4 h.

3.5.2.2.3. Subcultivo

Después de la incubación por el período especificado, agitar bien los tubos y estriar con ansa de 3 mm a partir de cada uno de los tubos en la superficie de placa de agar PEMBA o agar MYP.

Incubar las placas invertidas a 37°C (PEMBA) o a 30°C (MYP) durante 18 h a 24 h. Si las colonias no pueden verse bien incubar las placas por otras 24 h adicionales. Si se usa placas de agar PEMBA, la incubación posterior puede ser llevada a cabo a temperatura ambiente.

3.5.2.2.4. Selección de las placas

Después de la incubación completa, examinar las placas para determinar la presencia de colonias típicas y atípicas

- Colonias típicas: En agar PEMBA, las colonias típicas de presunto *Bacillus cereus* son de alrededor de 2 mm a 5 mm, tienen un borde irregular entre rugoso y radicular, con aspecto brillante en la superficie, de color turquesa a azul, posiblemente con centro blanco grisáceo contra el fondo azul, y tienen un halo de precipitación (reacción de la yema de huevo) de hasta 5 mm de ancho.

En agar MYP, las colonias típicas son de 2 mm a 5mm de tamaño, rugosas. Tienen una coloración rosa contra el fondo carmesí y un halo de precipitación (reacción de la yema de huevo) de hasta 5 mm de ancho.

- Colonias atípicas: Si las placas tienen un alto contenido de flora acompañante que fermenta el manitol, la coloración de las colonias y del fondo puede reducirse y no ser visible. Además, algunas cepas de presunto *Bacillus cereus* tienen solamente una reacción leve con la yema de huevo o ninguna. En tales casos y en otros casos dudosos, esas colonias deberían ser también sometidas a la confirmación.

3.5.2.2.5. Confirmación

Las colonias típicas y las atípicas en agar PEMBA o MYP deben ser confirmadas por medio del test de hemólisis en agar sangre de oveja. Además, las colonias típicas y las atípicas en agar PEMBA (pero no en agar MYP) pueden ser confirmadas por microscopía.

3.5.2.2.5.1. Selección y purificación de las colonias para confirmación

Seleccionar tres colonias de cada placa, de acuerdo a lo indicado en 3.5.2.2.4. Si hay menos de tres colonias en la placa, tomar todas las colonias presentes. Confirmar esas colonias como se especifica en 3.5.2.2.5.2. ó 3.5.2.2.5.3

Si las placas presentan sobrecrecimiento y no es posible seleccionar colonias bien aisladas, tomar material de las colonias de tres puntos y estriar en placas con el medio selectivo (PEMBA o MYP). Incubar las placas a 37°C (agar PEMBA) o a 30°C (agar MYP) por 18 h a 24 h. Seleccionar de cada placa al menos una colonia bien aislada. Confirmar como se especifica en 3.5.2.2.5.2. ó 3.5.2.2.5.3

3.5.2.2.5.2 Confirmación por el test de hemólisis en agar sangre de oveja (PEMBA o MYP)

Estriar las colonias seleccionadas en 3.5.2.2.1. en la superficie de placas de agar sangre de oveja de modo de obtener colonias aisladas. Incubar a 30°C durante 24 h y leer la reacción de hemólisis. Cada colonia rodeada de una zona clara se considera hemólisis positiva.

3.5.2.2.5.3. Confirmación microscópica (PEMBA)

- Coloración: transferir algo de material del centro de la colonia en el caso de cultivos de 24 h, o de la periferia en caso de cultivos viejos, usando un ansa de inoculación a un portaobjeto desgrasado y suspender en una pequeña gota de agua. Dejar secar al aire y fijar por calentamiento. Luego colorear las esporas sobre agua hirviendo con la solución de verde de malaquita. Después de 2 minutos, enjuagar el exceso de colorante con agua, secar el portaobjeto y cubrir con una capa de la solución Sudan black B para colorear la

grasa intracelular. Dejar durante 15 minutos, luego lavar con xileno, secar con papel de filtro y recolorar con la solución de safranina el esporangio. Después de 20 segundos, volcar el exceso de colorante, enjuagar con agua y secar al aire.

- Observación microscópica: examinar el portaobjeto al microscopio usando aceite de inmersión. Como regla, las células con forma de ladrillos de presunto *Bacillus cereus* están agrupadas en cadenas y son de 4 μ a 5 μ de largo, 1 μ a 1,5 μ de ancho y contienen gran cantidad de grasa intracelular que se colorea de negro. La coloración verde de las esporas puede ser central o subterminal, pero nunca deforma la coloración roja del esporangio.

3.5.2.3. Método de detección

3.5.2.3.1. Porción de muestra para el ensayo y suspensión inicial

Preparar la suspensión inicial de acuerdo al ítem 3.5.1.1

3.5.2.3.2. Inoculación e incubación

Agregar 1 ml de la suspensión inicial a un tubo con 9 ml del caldo triptona soja polimixina (TSPB) simple concentración (es decir 0.1 g ó 0.1 ml de la muestra) ó 10 ml de la suspensión inicial a un tubo con 10 ml del caldo triptona soja polimixina (TSPB) doble concentración (es decir 1 g ó 1 ml de la muestra). Para cantidades más grandes de muestra de ensayo, preparar la suspensión inicial agregando x ml o x g de la muestra a 9 x ml del diluyente (ver 3.5.1.1.). Luego agregar toda la suspensión inicial a 90 x ml del caldo triptona soja polimixina (TSPB) simple concentración (ejemplo agregar 5 ml ó 5 g de la muestra a 45 ml del diluyente y agregar todo el volumen de suspensión inicial a 450 ml del caldo TSPB simple concentración). Incubar el tubo o frasco inoculado a 30°C durante 48 h \pm 4 h

3.5.2.3.3. Subcultivo

Luego de mezclar, si es posible usando un Vortex, estriar con ansa a partir del tubo o frasco, en la superficie de una placa de agar PEMBA o agar MYP. Luego proceder como en 3.5.2.2.3, segundo párrafo.

3.5.2.3.4. Selección de las placas

Proceder como en 3.5.2.2.4.

3.5.2.3.5. Confirmación

Proceder como en 3.5.2.2.5.

3.5.3. Cálculo y expresión de resultados

3.5.3.1. Método de enumeración para la determinación del número más probable (NMP)

Para cada dilución del medio líquido selectivo de enriquecimiento inoculado (3.5.2.2.2.) registrar el número de tubos en los que la presencia de presunto *Bacillus cereus* ha sido confirmada. Designar esos tubos como positivos.

3.5.3.1.1. Selección de resultados positivos para el cálculo de NMP de (ISO 7218)

Hay combinaciones de tubos positivos con una probabilidad de aparición mucho mayor que otras. Por ejemplo, es mucho menos probable que aparezca una combinación de resultados positivos de 0, 0, 3 que una combinación de 3, 2, 1. Para cuantificar esta probabilidad, se ha asignado un índice de 0 a 3 a todas las combinaciones posibles de resultados positivos. La categoría 1 corresponde a los resultados de probabilidad más alta, mientras que los resultados de la categoría 3 son raros y no son fáciles de reproducir. Los peores casos son los resultados de la categoría 0, los cuales deberían considerarse con un alto grado de desconfianza. Asumiendo que los resultados del análisis son correctos, debería esperarse que el 95% de las combinaciones correspondan a la categoría 1, el 4 % a la categoría 2 y el 0.9% a la categoría 3 y solamente el 0.1% a la categoría 0. En la tabla 2 del Anexo 3 se explican con más detalles las categorías.

En el caso que se realicen más de tres diluciones, la selección de la combinación "correcta" de tres diluciones consecutivas no siempre es muy evidente. Sin embargo, se puede hacer fácilmente registrando todas las combinaciones posibles de tubos positivos, determinando en la tabla 1 a cual categoría corresponde.

Por consiguiente, se aplican las reglas siguientes:

- Se selecciona la combinación de tres diluciones consecutivas con un perfil de categoría 1 para obtener el índice de NMP. Si se obtiene más de una combinación con perfil de categoría 1, se utiliza la que tenga un mayor número de tubos positivos.
- Si no se encuentra ninguna combinación de categoría 1, se utiliza la que presente un perfil de categoría 2. Si se obtiene más de una categoría con perfil de categoría 2, se utiliza la que tenga un mayor número de tubos positivos.
- Si no se encuentra ninguna combinación de categoría 2, se utiliza la que presente un perfil de categoría 3. Si se obtiene más de una categoría con perfil de categoría 3, se utiliza la que tenga un mayor número de tubos positivos.

En la tabla siguiente se muestran algunos ejemplos

Ejemplo de selección de resultados positivos para el cálculo de NMP

Muestra	Número de tubos positivos obtenidos a partir de tres tubos incubados para las siguientes cantidades de muestra inoculada por tubo ^a					NMP ^b		
						Producto líquido (ml ⁻¹)	Resto de productos (g ⁻¹)	
	Producto líquido	10 ml	1 ml	10 ⁻¹ ml	10 ⁻² ml	10 ⁻³ ml		
	Resto de productos	1 g	10 ⁻¹ g	10 ⁻² g	10 ⁻³ g	10 ⁻⁴ g		
1		<u>3</u>	<u>3</u>	<u>2</u>	1	0	1,1 × 10 ¹	1,1 × 10 ²
2		3	<u>3</u>	<u>3</u>	<u>0</u>		2,4 × 10 ¹	2,4 × 10 ²
3		2	2	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	7,4	7,4 × 10 ¹
4		<u>3</u>	<u>3</u>	<u>0</u>	0	0	2,4	2,4 × 10 ¹
5		<u>2</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	1	0	2,1 × 10 ⁻¹	2,1

^a El subrayado indica la combinación escogida.

^b Calculado mediante el uso del índice de NMP (véase la tabla B.5).

Fuente: ISO 7218

3.5.3.1.2. Expresión de resultados.

Seleccionar tres diluciones consecutivas de acuerdo al punto 3.5.3.1.1. y determinar el NMP entrando en la tabla 1 del Anexo3.

Utilizando el índice de NMP determinado en la tabla 1, se determina la cantidad más probable de microorganismos en el volumen de referencia.

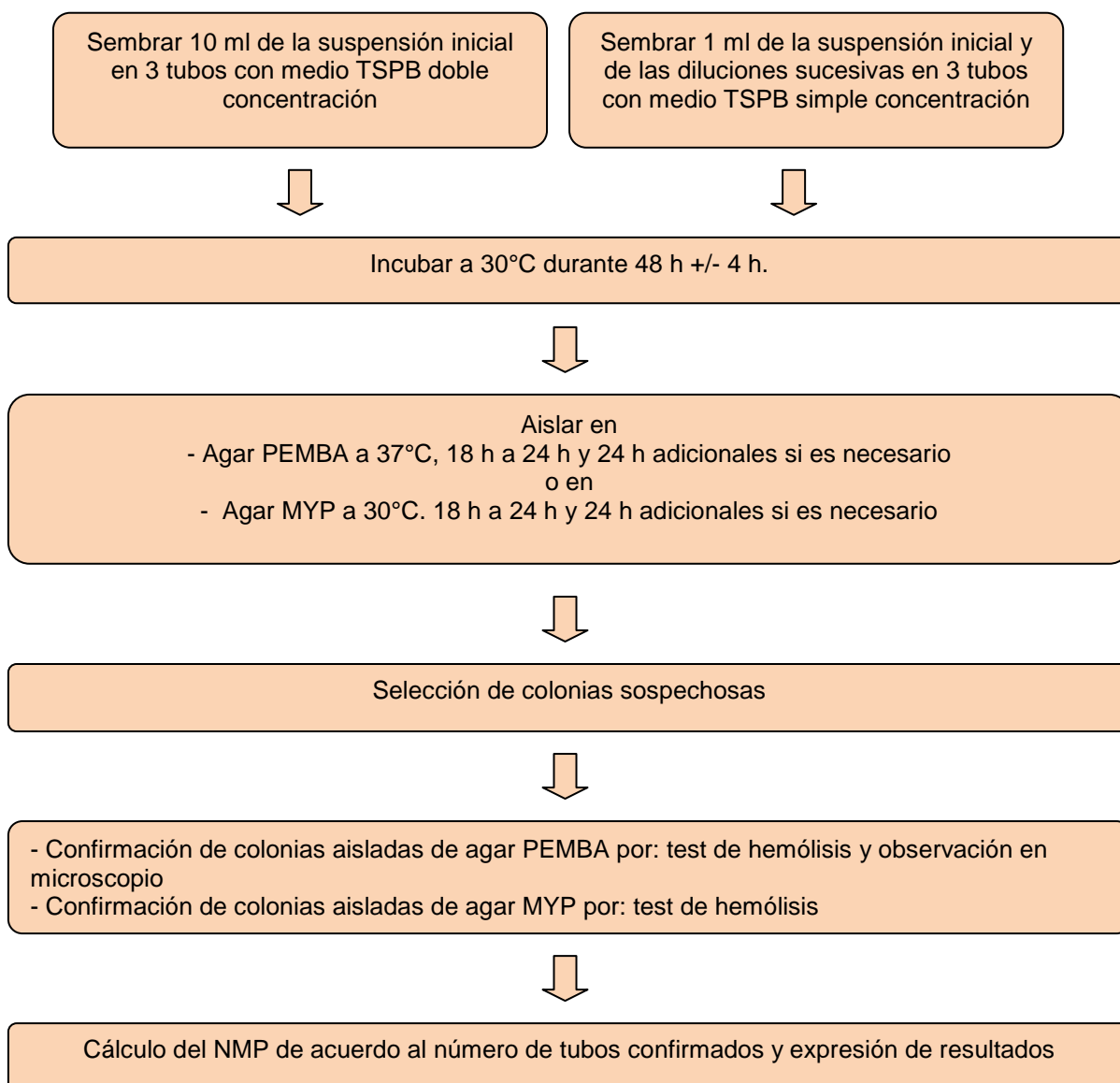
El resultado se expresa cómo el número más probable de presuntos *Bacillus cereus* por gramo o mililitro

3.5.3.2. Método de detección

De acuerdo a la interpretación de los resultados, reportar la presencia o ausencia de presuntos *Bacillus cereus* en la porción testada, especificando en gramos o mililitros de muestra.

4. ANEXOS

ANEXO 1: Diagrama de flujo del procedimiento para enumeración de presuntos *Bacillus cereus* por la técnica de número más probable (NMP)



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. Solución salina peptonada

Digesto enzimático de caseína	1.0 g
Cloruro de sodio	8.5 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.

3. Caldo triptona soja polimixina (TSPB)

.1. Medio base

Digesto enzimático de caseína	17.0 g
Digesto enzimático de soja	3.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Glucosa	2.5 g
Fosfato ácido disódico (Na_2HPO_4)	1.0 g
Agua destilada (a)	1000 ml

(a) 500 ml para el caldo doble concentración.

Disolver los componentes en agua por calentamiento y agitación. Ajustar el pH para que después de la esterilización sea de 7.3 ± 0.2 a 25°C . Distribuir en tubos de 16 mm x 160 mm, 10 ml para el caldo doble concentración y 9 ml para el caso simple concentración. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

.2. Solución de sulfato de polimixina B

Sulfato de polimixina B	500.000 unidades (equivalente a 0.05 g aproximadamente)
Agua destilada	50 ml

Disolver el sulfato de polimixina B en agua destilada. Esterilizar por filtración.

3.3. Medio completo

Inmediatamente antes de usar, agregar 200 µl (caldo doble concentración) y 100 µl (caldo simple concentración) de la solución de sulfato de polimixina a cada uno de los tubos que contienen el medio.

4. Agar polimixina piruvato yema de huevo manitol azul de bromotimol (PEMBA)

4.1. Medio base

Digesto enzimático de caseína	1.0 g
D-Manitol	10.0 g
Piruvato de sodio	10.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	2.0 g
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0.1 g
Fosfato ácido disódico (Na ₂ HPO ₄)	2.5 g
Fosfato diácido monopotásico (KH ₂ PO ₄)	0.25 g
Azul de bromotimol	0.12 g
Agar	9g a 18g*
Agua destilada	940 ml

* dependiendo de la firmeza del agar

Disolver los componentes en agua destilada por calentamiento y agitación. Ajustar el pH para que después de la esterilización sea de 7.2 ± 0.2 a 25°C. Dispensar en porciones de 8 ml en tubos. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

4.2. Solución de sulfato de polimixina B

Preparar como en 3.2.

4.3. Emulsión de yema de huevo al 20%

Usar huevos de gallina frescos, limpios y con sus cáscaras intactas. Lavar los huevos, usando un cepillo, en detergente líquido. Enjuagar bajo agua corriente, sumergir por 30 segundos en alcohol 70% en

volumen y secar. Usando procedimientos asépticos, romper cada huevo y separar la yema de la clara por repetidas transferencias de la yema de una mitad de la cáscara del huevo a la otra. Poner las yemas en un recipiente con graduación y agregar cuatro partes en volumen de agua estéril. Transferir asépticamente a un recipiente estéril y mezclar vigorosamente.

Calentar la mezcla durante 2 h en baño de agua a 47°C. Luego dejar durante 18 h a 24 h a 3°C ± 2°C para permitir que se forme un precipitado.

Recoger el sobrenadante asépticamente.

La emulsión puede ser guardada a 3°C ± 2°C por no más de 72 h.

Los dos medios selectivos descritos en esta norma son originalmente preparados con emulsión de huevo al 20 %. Hay emulsiones disponibles comercialmente, en algunos casos con diferentes concentraciones, las que pueden usarse teniendo en cuenta las instrucciones del fabricante, especialmente en lo referente a la vida útil y asegurándose que la concentración sea apropiada para el medio de cultivo tal como se lo describe en los puntos 4 y 5.

4.4. Medio completo

Medio base (3.1)	940 ml
Solución de sulfato de polimixina (3.2)	10 ml
Emulsión yema de huevo (3.3)	50 ml

Preparación:

Fundir el agar base y enfriar en baño de agua a 47°C.

Calentar los otros ingredientes a la misma temperatura y agregarlos agitando continuamente.

- Preparación de las placas de Petri: Transferir 12.5 ml del medio completo en placas de Petri y dejar solidificar. Las placas pueden guardarse a 3°C ± 2°C hasta 4 días. Antes de ser usadas, secar las placas en estufa a una temperatura entre 25°C y 50°C, preferentemente sin la tapa y con la superficie del agar hacia abajo hasta que la misma esté seca.

5. Agar manitol yema de huevo polimixina (MYP)

5.1. Medio base

Digesto enzimático de caseína	10.0 g
Extracto de carne	1.0 g
D- manitol	10.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	10.0 g
Rojo fenol	0.025 g

Agar	9g a 18g*
Agua destilada	900 ml

*dependiendo de la firmeza del agar

Disolver los componentes en agua, por calentamiento y agitación. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor después de la esterilización de 7.2 ± 0.2 a 25°C . Fraccionar cada 90 ml del medio en recipientes de capacidad adecuada. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

5.2. Solución de sulfato de polimixina B

Preparar como en 3.2.

5.3. Emulsión de yema de huevo

Preparar como en 4.3.

5.4. Medio completo

Medio base (5.1)	90.0 ml
Solución de sulfato de polimixina (5.2)	1.0 ml
Emulsión yema de huevo (5.3)	10.0 ml

Fundir el agar base y enfriar en baño de agua a 47°C .

Calentar los otros ingredientes a la misma temperatura y agregarlos agitando continuamente.

- Preparación de las placas de Petri: transferir de 15 a 20 ml del medio completo en placas de Petri y dejar solidificar. Las placas pueden guardarse a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta 4 días. Antes de ser usadas, secar las placas en estufa a una temperatura entre 25°C y 50°C , preferentemente sin la tapa y con la superficie del agar hacia abajo hasta que la misma esté seca.

6. Soluciones de coloración para identificación microscópica

6.1. Solución de oxalato de verde de malaquita

Oxalato de verde de malaquita	5.0 g
Agua	100 ml

Disolver el oxalato de verde de malaquita en agua.

6.2. Solución de Sudan black B

Sudan Black B	0.3 g
Etanol 70%	100 ml

Disolver el Sudan black B en alcohol.

6.3. Xileno

6.4. Solución de safranina

Safranina	0.5 g
Agua	100 ml

Disolver la safranina en agua.

7. Agar sangre de oveja

7.1. Medio base

Digesto enzimático de caseína	15.0 g
Digesto enzimático de soja	5.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Agar	9g a 18g*
Agua destilada	1000 ml

*dependiendo de la firmeza del agar

Disolver los componentes o el medio deshidratado en agua, por ebullición. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor después de la esterilización de 7.3 ± 0.2 a 25°C. Fraccionar en recipientes de capacidad adecuada. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

7.2. Sangre de oveja desfibrinada

7.3. Medio completo

Medio base (5.1)	100 ml
Sangre de oveja desfibrinada	5ml a 7ml

Fundir el agar base y enfriar en baño de agua a 47°C. Agregar la sangre desfibrinada. Mezclar.

Verter aproximadamente 15 ml del medio en placas de Petri estériles y dejar solidificar.

ANEXO 3:
Tabla 1: Índices de NMP y límites de intervalo de confianza (95%) cuando se utilizan tres porciones analíticas de 1g (ml), tres de 0.1g (ml) y tres de 0.01 g (ml)

Número de resultados positivos			Índice de NMP ^a	Categorías ^b	Límites del intervalo de confianza (95%) ^{a,c}	
					Límite inferior	Límite superior
0	0	0	<0,30		0,00	0,94
0	0	1	0,30	3	0,01	0,95
0	1	0	0,30	2	0,01	1
0	1	1	0,61	0	0,12	1,7
0	2	0	0,62	3	0,12	1,7
0	3	0	0,94	0	0,35	3,5
1	0	0	0,36	1	0,02	1,7
1	0	1	0,72	2	0,12	1,7
1	0	2	1,1	0	0,4	3,5
1	1	0	0,74	1	0,13	2
1	1	1	1,1	3	0,4	3,5
1	2	0	1,1	2	0,4	3,5
1	2	1	1,5	3	0,5	3,8
1	3	0	1,6	3	0,5	3,8
2	0	0	0,92	1	0,15	3,5
2	0	1	1,4	2	0,4	3,5
2	0	2	2,0	0	0,5	3,8
2	1	0	1,5	1	0,4	3,8
2	1	1	2,0	2	0,5	3,8
2	1	2	2,7	0	0,9	9,4
2	2	0	2,1	1	0,5	4
2	2	1	2,8	3	0,9	9,4
2	2	2	3,5	0	0,9	9,4
2	3	0	2,9	3	0,9	9,4
2	3	1	3,6	0	0,9	9,4
3	0	0	2,3	1	0,5	9,4
3	0	1	3,8	1	0,9	10,4
3	0	2	6,4	3	1,6	18,1
3	1	0	4,3	1	0,9	18,1
3	1	1	7,5	1	1,7	19,9
3	1	2	12	3	3	36
3	1	3	16	0	3	38
3	2	0	9,3	1	1,8	36
3	2	1	15	1	3	38
3	2	2	21	2	3	40
3	2	3	29	3	9	99
3	3	0	24	1	4	99
3	3	1	46	1	9	198
3	3	2	110	1	20	400
3	3	3	>110			

^b: ver tabla 2

Fuente: ISO 7218

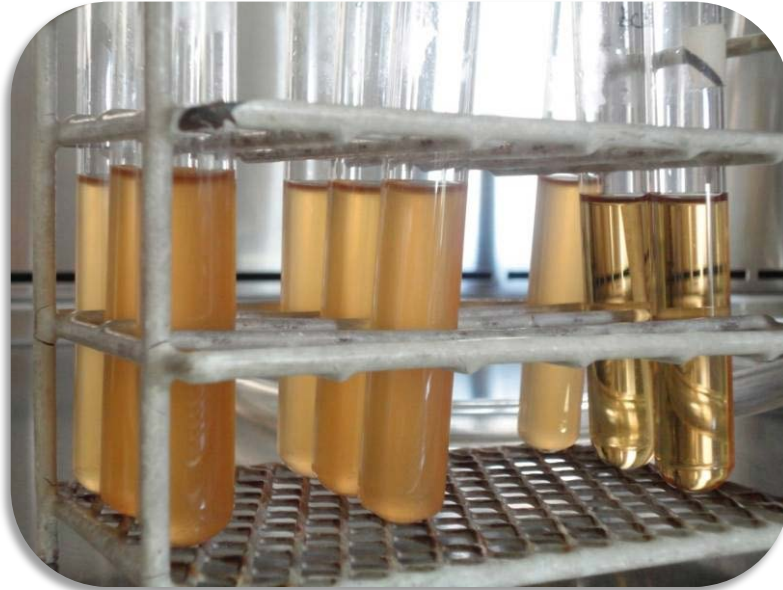
Tabla 2:

Categoría	Definición
1	Cuando el número de bacterias de la muestra es igual al valor de NMP hallado, este resultado es de los que tienen mayor probabilidad de obtenerse. Como mucho, hay un 5 % de probabilidad de obtener un resultado que es menos probable que el de menor probabilidad de esta categoría
2	Cuando el número de bacterias de la muestra es igual al valor de NMP hallado, este resultado es de los que tienen una probabilidad de obtenerse menor que incluso el resultado menos probable de la categoría 1, pero hay en el mejor de los casos solamente un 1% de probabilidad de obtener un resultado que es menos probable que el de menor probabilidad de esta categoría.
3	Cuando el número de bacterias de la muestra es igual al valor de NMP hallado, este resultado es de los que tienen una probabilidad de obtenerse menor que incluso el resultado menos probable de la categoría 2, pero hay en el mejor de los casos solamente un 0.1% de probabilidad de obtener un resultado que es menos probable que el de menor probabilidad de esta categoría.
0	Cuando el número de bacterias de la muestra es igual al valor de NMP hallado, este resultado es de los que tienen una probabilidad de obtenerse menor que incluso el resultado menos probable de la categoría 3. Solamente hay un 0.1% de probabilidad de obtener un resultado de esta categoría, incluso sin que se haya cometido ninguna incorrección

^a Antes de comenzar los análisis, debería decidirse que categoría se va a aceptar, es decir, solamente la categoría 1, la 1 y la 2 o incluso la 1, la 2 y la 3. Cuando se vaya a tomar una decisión de gran importancia en base a los resultados, solamente debería aceptarse la categoría 1, o en todo caso la 1 y la 2. Los resultados de la categoría 0 deberían considerarse con un alto grado de desconfianza.

ANEXO 4: FOTOS

1. Caldo triptona soja polimixina (TSPB)



Método de NMP para recuento de presuntos *Bacillus cereus* en caldo TSPB

2. Agar sangre de oveja



Bacillus cereus: reacción positiva para el test de hemólisis

3. Agar manitol yema de huevo polimixina (MYP)



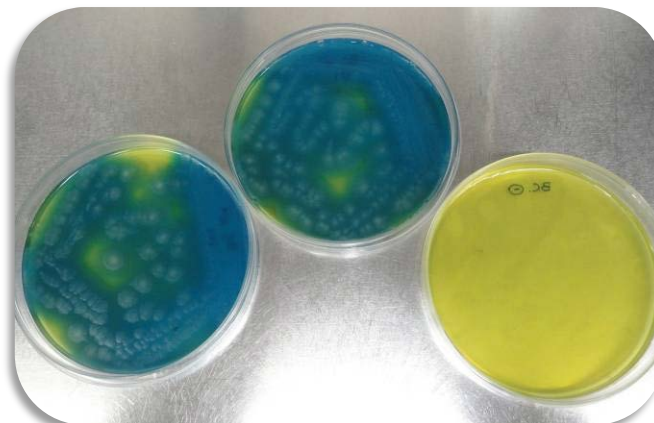
Bacillus cereus ATCC 4778, en agar MYP, 24 h de incubación

4. Agar polimixina piruvato yema de huevo manitol azul de bromotimol (PEMBA) y Agar manitol yema de huevo polimixina (MYP)



Bacillus cereus ATCC 4778

5. Agar PEMBA



Bacillus cereus ATCC 4778

5. REFERENCIAS

(1) International Standard. ISO 21871. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the determination of low numbers of presumptive *Bacillus cereus*. Most probable number technique and detection method. First edition 2006-01-15

(2) International Standard. ISO 6887 – 1. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. First edition, 1999-02-15.

(3) International Standard. ISO 7218: 2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs. General requirements and guidance for microbiological examinations. Third edition, 2007-08-15.

NOTA: Las siguientes normas de referencias son indispensables para la aplicación del presente procedimiento. Para cada norma de referencia debe aplicarse la edición citada, en caso de no especificarse la misma, deberá aplicarse la última edición (incluyendo cualquier modificación).

ISO 6887-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

ISO 6887-2, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products

ISO 6887-3, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products

ISO 6887-4, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products meat and meat products, and fish and fishery products

ISO 7218, Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations.

ISO 6887-5, Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products

ISO/TS 11 33-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 1 : General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory

ISO/TS 11 133-2:2003, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media

A series of horizontal dashed lines for writing, spanning the width of the page.

Clostridium perfringens



Clostridium perfringens en alimentos

1. Generalidades

El género *Clostridium* está formado por más de cien especies con limitada relación genética y propiedades bioquímicas diversas.

Comprende a bacilos Gram positivos, anaerobios, esporulados. Son ubicuos pudiendo ser encontrados en el suelo y aguas residuales como así también en la flora intestinal de hombres y animales.

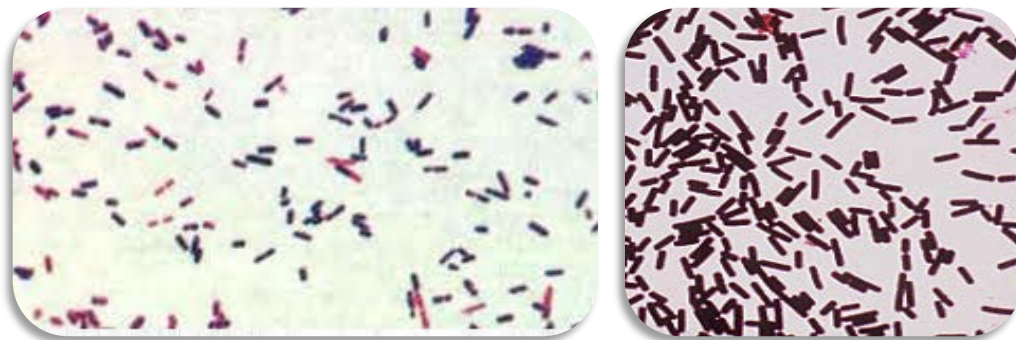
En su mayoría son saprófitos, pero los patógenos pueden causar enfermedades graves que pueden ser fatales, como gangrena gaseosa, botulismo, tétanos, infecciones de piel y partes blandas, colitis asociada a antibióticos e intoxicaciones alimentarias.

La capacidad para provocar enfermedad está vinculada a la posibilidad de sobrevivir en condiciones ambientales adversas mediante la formación de esporas, crecer rápidamente y producir toxinas histolíticas, enterotoxinas y neurotoxinas.

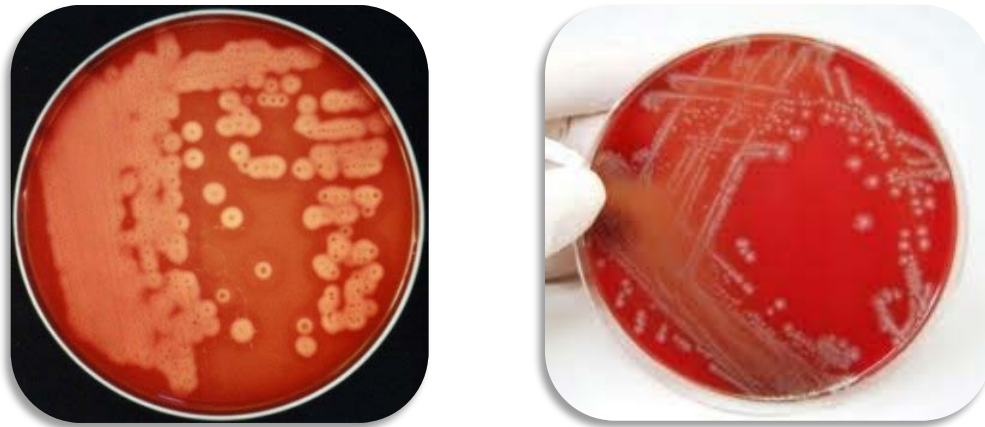
Clostridium perfringens es la especie del género *Clostridium* más frecuentemente aislada en materiales clínicos. Pertenece a la familia de las *Bacillaceae*.

Es un bacilo Gram-positivo grande (1μ de ancho por 4μ de largo, en promedio) de bordes rectos y extremos romos, inmóvil, formador de esporas que se encuentra en los intestinos de los seres humanos y de varios animales, en el suelo, en el agua, en los alimentos (sobre todo en las carnes que no están bien cocinadas), entre otros.

Anaeróbico significa que es incapaz de crecer en presencia de oxígeno libre. Desarrolla rápidamente en anaerobiosis, produciendo colonias grandes (1 a 3 mm de diámetro) que muestran doble halo de hemólisis en las placas de agar sangre.



Clostridium perfringens teñidos con la tinción de Gram



Clostridium perfringens: colonias hemolíticas en agar sangre

Sus características morfológicas, la demostración de presencia de esporas, el rápido desarrollo en anaerobiosis y algunas propiedades bioquímicas (lecitinasa) conforman un perfil que facilita su rápida detección en el laboratorio.

Las células vegetativas de *C. perfringens* en la fase exponencial de la curva de crecimiento son muy sensibles a la refrigeración y a la congelación. Así sucede que las pruebas en alimentos congelados o refrigerados frecuentemente sólo revelan los esporos presentes de *C. perfringens* (que sobreviven a la refrigeración y a la congelación) y no las células vegetativas que se habrán inactivado.

C. perfringens es el agente etiológico de muchas enfermedades y es la tercera causa de toxoinfección alimentaria bacteriana después de *Salmonella* spp y *Staphylococcus aureus*.

Produce toxinas que pueden causar otras enfermedades como la enteritis necrótica o la gangrena gaseosa.

En la gangrena gaseosa, el *Clostridium* provoca destrucción en los tejidos infectados si persiste. Esto es provocado por la liberación de exoenzimas específicas que atacan a las moléculas constituyentes de los tejidos animales: fosfolipasas, hemolisinas, colagenasas, proteasas, que provocan la putrefacción del tejido acompañada de una producción de gas, y de ahí su nombre ("gaseosa"). La solución, llegado este nivel, es la amputación de la zona afectada; de no ser así la infección suele acabar con la muerte del animal (cerdos, pollos, caballos y humanos).

Es el tercer indicador de contaminación fecal de las aguas. Se destruye con temperaturas superiores a 121°C.

2. Patogenia

Existen dentro de la especie cinco tipos llamados A, B, C, D y E.

C. perfringens A es el responsable de la mayoría de los procesos infecciosos.

Produce una enterotoxina (polipéptido de 35.000 Daltons de peso molecular) que se comporta como un superantígeno promoviendo la liberación de mediadores de inflamación en forma masiva.

La enterotoxina es susceptible a pronasa pero no a tripsina ni quimiotripsina.

En el intestino delgado, la enterotoxina se une a un receptor de membrana del ribete en cepillo e induce una alteración de la permeabilidad calcio dependiente resultando en una pérdida de iones y metabolitos. Esta pérdida electrolítica altera la función metabólica intracelular provocando daño morfológico y eventual lisis.

3. Epidemiología

La enfermedad se produce cuando el individuo ingiere alimento contaminado con un elevado número de microorganismos productores de enterotoxinas ($>10^6$ UFC) los cuales al llegar al intestino delgado esporulan y liberan las enterotoxinas.

Los alimentos que pueden estar contaminados son carnes vacuna, porcina, pollo, salsas cocinadas, guisos, sopas y no refrigerados.

Estos alimentos, cuando son almacenados a temperaturas inadecuadas aumentan el riesgo de infección y enfermedad por *Clostridium perfringens*, ya que las esporas presentes después de la cocción pueden germinar y potencialmente crecer hasta un número alto y peligroso. El mantenimiento del alimento en la zona de temperaturas peligrosas por más de dos horas, es la causa principal de ETA por *Clostridium perfringens*.

No son comunes los brotes familiares pero si los producidos a través de alimentos preparados comercialmente y destinados a restaurantes o instituciones.

Para confirmar la existencia de una enfermedad de este tipo es necesario recuperar el agente de la muestra de alimento y del paciente. Se deben recuperar al menos 10^5 UFC de *C. perfringens* por gramo de alimento y 10^6 UFC de microorganismos por gramo de heces en las primeras 24 horas.

Es posible detectar anticuerpos contra la enterotoxina pero ellos no tienen valor protector.

4. Clínica

Entre 7 y 15 horas después de la ingesta, el paciente presenta diarrea líquida espumosa y maloliente y dolores abdominales. La enfermedad tiende a ser autolimitada en pacientes que no presenten otras complicaciones.

5. Diagnóstico

El diagnóstico es sospechado por la presencia del agente en el alimento y el paciente. También puede buscarse la presencia de la enterotoxina en las heces utilizando ELISA o hemaglutinación pasiva reversa; también se han desarrollado técnicas moleculares para la detección de estos agentes.

6. Tratamiento y prevención

En general, no requiere tratamiento antimicrobiano, sólo medidas de sostén. Como acción preventiva, debe ser mantenida una refrigeración adecuada de los alimentos cocidos de no ser consumidos de inmediato.

El control de *C. perfringens* se basa casi totalmente en los procedimientos de cocción y de enfriamiento. La mayoría de los brotes son el resultado de un enfriamiento lento de los alimentos luego de su cocción, y un mantenimiento prolongado en las temperaturas peligrosas de crecimiento (entre 10°C y 60°C). Por lo tanto, las medidas principales para prevenir una toxiinfección por *C. perfringens* son:

- Los alimentos deben ser cocinados completamente a una temperatura interna entre 63°C a 74°C y luego mantenidos en una temperatura mayor a 60°C hasta el servicio/ consumo.
- Si el alimento no va a ser consumido inmediatamente, se debe enfriar rápida y adecuadamente siguiendo el Procedimiento de Enfriado Rápido de Alimentos. Debe permanecer el menor tiempo posible en el rango de temperaturas de 60°C a 10°C, y luego ser mantenido a temperaturas inferiores a 5°C.
- El recalentamiento de los alimentos debe realizarse a una temperatura mayor a 74°C en su interior inmediatamente antes de su consumo.

Las Buenas Prácticas Agropecuarias contribuyen a reducir la contaminación de los alimentos con tierra y materia fecal animal, minimizando así la carga bacteriana general en la materia prima. La elaboración con Buenas Prácticas de Manufactura, evitando la contaminación cruzada entre alimentos cocidos y crudos o contaminados, y las Buenas Prácticas de Higiene son esenciales para la prevención de éste y otros microorganismos.

Referencias

- (1) Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins.
- (2) U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition.
- (3) Handbook <http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Clostridiumperfringens&oldid=52349170>.
- (4) Manual of Clinical Microbiology, Patrick R. Murray, 1995.
- (5) Principles and Practice of Infectious Diseases, Gerald L. Mandell, 1995.
- (6) Diagnóstico Microbiológico, Elmer W. Koneman, 1999.
- (7) Ohio State University Extension. *Clostridium perfringens*: Not the 24-hour flu, HYG-5568-98. <http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/5000/5568.html> (Last Accessed: 23 March 2010).
- (8) Enfermedades Transmitidas por Alimentos: Ficha Técnica n°5: Toxiinfección por Clostridium perfringens: RENAPRA
- (9) US Food and Drug Administration. US FDA/CFSAN - Bad Bug Book - *Clostridium perfringens*, April 2009.
<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070483.htm> (Last Accessed: 23 March 2010).
- (10) US Food and Drug Administration. FDA Food Code. July 2009. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/foodcode.html> (Last Accessed: 04 September 2009).
- (11) Schmidt, R.H., R.M. Goodrich, D.L. Archer, and K.R. Schneider. FSHN033/FS099: General Overview of the Causative Agents of Foodborne Illness. <http://edis.ifas.ufl.edu/FS099> (Last Accessed: 04 September 2009)

NOTAS PERSONALES

Recuento de *Clostridium perfringens* en muestras de alimentos

Técnica de recuento en placa

Procedimiento según
International Standard Organization ISO 7937:2004

1. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar la enumeración y confirmación de *Clostridium perfringens* viables por la técnica de recuento de colonias en placa, en muestras de alimentos y muestras ambientales de las áreas de producción y manipulación de alimentos.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica para realizar la enumeración y confirmación de *Clostridium perfringens* viables por la técnica de recuento de colonias en placa en muestras de alimentos y muestras ambientales en el área de producción y manipulación de alimentos.

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.

Normas de referencia: Para la aplicación del presente procedimiento son indispensables las normas citadas en el punto 5. Referencias

3. DESARROLLO

3.1. Definiciones

Para el propósito de este documento, *Clostridium perfringens* es una bacteria que forma colonias características (precipitado negro, causado por la reducción de sulfito a sulfuro y por tanto colonias negras) en el medio selectivo especificado, y da reacciones positivas para cualquiera de las dos técnicas de confirmación especificadas en este procedimiento.

3.2. Principio (ver ANEXO 1)

El método está basado en las siguientes etapas:

3.2.1. Preparación de la muestra y diluciones sucesivas

- 3.2.2. Aislamiento en medio selectivo y diferencial en doble capa del mismo medio.
- 3.2.3. Recuento de colonias características
- 3.2.4. Confirmación bioquímica de colonias sospechosas aisladas.

3.3. Medios de cultivo, soluciones, reactivos para propiedades bioquímicas y equipos (ver ANEXO 2)

- 3.3.1. Agua peptona bufferada (BPW)
- 3.3.2. Solución salina peptonada (SFP)
- 3.3.3. Agar sulfito-cicloserina (SC) para aislamiento de *Clostridium perfringens*
- 3.3.4. Solución de D-cicloserina (4 mg en 100 ml)
- 3.3.5. Medio de tioglicolato fluído
- 3.3.6. Medio lactosa-sulfito (LS)
- 3.3.7. Solución de disulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ anhidro al 1.2 %)
- 3.3.8. Solución citrato férrico amónico (1%)
- 3.3.9. Medio para nitrato movilidad
- 3.3.10. Reactivo para detección de nitrito (solución de ácido sulfónico 5-amino-2-naftalen (5-2-ANSA) y ácido sulfanílico)
- 3.3.11. Zinc en polvo
- 3.3.12. Galería API 20 A bioMerieux (opcional)
- 3.3.13. Estufa de esterilización
- 3.3.14. Autoclave
- 3.3.15. Jarra para incubación en atmósfera anaeróbica o cualquier otro aparato apropiado para incubación de cultivos en anaerobiosis.
- 3.3.16. Estufa de incubación: $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, $46^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$
- 3.3.17. Baño de agua o aparato similar capaz de mantener la temperatura entre 44°C y 47°C y a $46^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$, $46^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ y a $44^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$,
- 3.3.18. Peachímetro de exactitud 0.01 a $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.
- 3.3.19. Pipetas de 1 y 10 ml de capacidad, graduadas en intervalos de 0.1 y 0.5 ml respectivamente
- 3.3.20. Ansas de platino-iridio o níquel-cromo de aprox. 3 mm de diámetro y de punción del mismo material, o equivalentes estériles descartables.
- 3.3.21. Tubos de ensayo, botellas o frascos de capacidad apropiada, en particular de 16 mm x 160 mm, con campanita de Durham.
- 3.3.22. Caja de Petri, de vidrio o plástico, de 90 a 100 mm de diámetro.
- 3.3.23. Equipo de filtración para esterilización de soluciones.
- 3.3.24. Peras de goma para usar con las pipetas graduadas para dispensar los reactivos para detección de nitritos (si fuera necesario)

3.4. Muestreo

El plan de muestreo a utilizar está fuera del alcance de esta metodología.

3.5. Procedimiento

3.5.1. Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones (ISO 6887-1:1999)

NOTA: Para este punto referir a la norma ISO 6887 – 1 y las normas específicas para el alimento en cuestión. (Ver punto 5. Referencias)

3.5.1.1. Suspensión inicial

En un frasco estéril o bolsa de plástico estéril pesar con una incertidumbre de medición de $\pm 5\%$ una cantidad de masa x g o medir con una incertidumbre de medición de $\pm 5\%$ un volumen x ml (como mínimo 10 g ó 10 ml a menos que se indique otra cantidad).

Agregar una cantidad del diluyente igual a $9x$ g ó $9x$ ml (dilución 1/10) y homogeneizar de 1 a 3 minutos dependiendo del alimento.

Para evitar el daño de los microorganismos por cambios bruscos de temperatura, la temperatura del diluyente debería ser aproximada a la temperatura ambiente.

En el caso de recuento de esporas realizar un tratamiento térmico a la suspensión inicial, inmediatamente después de su preparación, por ejemplo 10 minutos a 80°C seguido de un enfriamiento rápido.

NOTA: En algunos casos, particularmente para los productos muy viscosos o muy espesos, podría ser necesario agregar mayor cantidad de diluyente lo cual debe tenerse en cuenta en las operaciones subsiguientes y / o en la expresión de resultados.

3.5.1.2. Diluciones decimales (ISO 6887-1:1999)

Transferir con una pipeta 1ml (con una incertidumbre de medición de $\pm 5\%$) de la suspensión inicial en un tubo con 9 ml del diluyente estéril.

Para una óptima precisión no introducir la pipeta más de 1 cm en la suspensión inicial y evitar el contacto entre la pipeta que contiene el inóculo y el diluyente estéril.

Mezclar utilizando preferentemente un agitador mecánico de 5 a 10 segundos para obtener la dilución 10^{-2} .

Si es necesario repetir esta operación a partir de la dilución 10^{-2} y diluciones sucesivas, utilizando en cada operación una nueva pipeta estéril para obtener las siguientes diluciones (10^{-3} , 10^{-4} , etc.). Se realizan las diluciones que sean necesarias para obtener un número apropiado de microorganismos para realizar el recuento. (Ver 3.5.3.)

3.5.1.3. Duración del procedimiento (ISO 6887-1)

El tiempo transcurrido entre el final de la preparación de la suspensión inicial y el instante en que el inóculo entra en contacto con el medio de cultivo no debe superar los 45 minutos, mientras que el lapso de tiempo límite entre la preparación de la suspensión inicial y el comienzo de la preparación de las diluciones decimales sucesivas es de 30 minutos.

NOTA: si la temperatura ambiente del laboratorio es muy alta estos dos lapsos de tiempo deben ser reducidos.

3.5.2. Inoculación e incubación

Transferir 1 ml de la muestra si el producto es líquido ó 1 ml de la suspensión inicial (dilución 1/10) y 1 ml de las diluciones sucesivas preparadas según 3.5.1.2. por duplicado en el centro de placas de Petri vacías. Verter entre 10 y 15 ml de agar SC, fundido y mantenido a 44°C - 47°C en baño de agua. Mezclar bien con el inóculo por rotación suave. Cuando el medio haya solidificado, agregar una sobrecapa de 10 ml del mismo agar SC. Incubar a 37°C ± 0.5°C durante 20 h ± 2 h en condiciones anaeróbicas (jarra de atmósfera modificada o contenedor semejante).

Una incubación más prolongada puede dar como resultado un ennegrecimiento en exceso de las placas.

Seguir el mismo procedimiento para las diluciones decimales preparadas en 3.5.1.2

3.5.3. Recuento y selección de las colonias

Después de la incubación por el período especificado, seleccionar todas las placas que contengan menos de 150 colonias, de éstas, si es posible, seleccionar las placas que representen diluciones sucesivas.

Contar en cada placa las colonias con características de presuntivos *Clostridium perfringens*.

- Colonias características: Colonias negras (precipitado negro, causado por la reducción de sulfito a sulfuro).

Seleccionar cinco colonias características y confirmar usando una de las técnicas descritas en 3.5.4.2 y 3.5.4.3.

3.5.4. Confirmación bioquímica (dos opciones)

3.5.4.1. General

Elegir una de las dos técnicas descritas en 3.5.4.2 y 3.5.4.3

Hay disponibles galerías comerciales que pueden ser usadas si responden a la norma ISO 7218.

3.5.4.2. Técnica de confirmación usando el medio lactosa-sulfito (LS)

NOTA. La reacción obtenida en el medio de lactosa-sulfito cuando se incuba a 46°C es muy específica para *Clostridium perfringens* y *Clostridium absonum*. Por lo tanto no es necesario asegurar la pureza de las colonias antes de la inoculación en tioglicolato y subsecuentemente en el medio de lactosa sulfito.

3.5.4.2.1. Inoculación e incubación

Inocular cada una de las colonias seleccionadas en medio de tioglicolato fluido. Incubar bajo condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 18 h a 24 h.

Después de la incubación, transferir sin demora 5 gotas del cultivo en tioglicolato al medio LS por medio de una pipeta estéril. Incubar aeróbicamente a 46°C durante 18 h a 24 h en baño de agua.

3.5.4.2.2. Interpretación

Examinar los tubos del medio LS para la producción de gas y la presencia de color negro (precipitado de sulfito de hierro). Las campanitas de Durham con más de un cuarto llenas de gas y los tubos con precipitado negro se consideran positivos.

En caso de duda, cuando la campanita de Durham presente menos de un cuarto lleno de gas en un medio ennegrecido, transferir sin demora, usando una pipeta estéril, 5 gotas del cultivo en medio LS a otro tubo de medio LS. Incubar en baño a 46°C durante 18h a 24h. Examinar este tubo como se describe anteriormente.

Bacterias que forman colonias características en medio SC y las cuales dan confirmación positiva con LS se consideran *C. perfringens*. En todos los otros casos, los tubos deberían ser considerados como negativos.

3.5.4.3. Técnica de confirmación usando los medios de nitrato-movilidad y lactosa-gelatina.

3.5.4.3.1. General

Esta técnica de confirmación necesita de colonias características bien aisladas. Si este no es el caso (por ejemplo si la superficie de las placas está con sobrecrecimiento y no es posible seleccionar colonias características bien aisladas) incubar cinco colonias características en tubos pre-desaireados de medio de tioglicolato fluido.

Incubar bajo condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 18 h a 24 h. Estriar las colonias en placas de SC agar base y agregar una capa de 10 ml de SC agar base.

Dejar solidificar e incubar anaerobicamente a 37°C durante 18 h a 24 h. Seleccionar de cada placa al menos una colonia característica y bien separada. Si fuera necesario, repetir el estriado e inoculación en placas de SC agar base hasta obtener colonias características, negras, bien aisladas.

Confirmar como se describe en 3.5.4.3.2. y 3.5.4.3.3.

3.5.4.3.2. Inoculación y lectura del medio de nitrato movilidad

Inocular por punción cada una de las colonias seleccionadas en medio de nitrato movilidad recientemente desaireado.

Incubar bajo condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 24 h. Examinar el tubo de nitrato movilidad para ver el tipo de crecimiento a lo largo de la línea de inoculación. La movilidad se evidencia por un crecimiento difuso en el medio fuera de la línea de inoculación.

Testear la presencia de nitrito por el agregado, con pipeta graduada y pera de goma, de 0.2 ml a 0.5 ml del reactivo para detección de nitritos a cada tubo de medio nitrato-movilidad.

ADVERTENCIA - Por razones de salud, llevar a cabo este test bajo campana.

La formación de un color rojo confirma la reducción de nitrato a nitrito. Si no se forma color rojo dentro de los 15 minutos, agregar una pequeña porción de zinc en polvo y dejar por 10 minutos. Si se forma un color rojo después de la adición del polvo de zinc, no ha ocurrido reducción de nitrato.

3.5.4.3.3. Inoculación y lectura del medio de lactosa-gelatina

Inocular cada una de las colonias seleccionadas en medio de lactosa-gelatina desaireado. Incubar bajo condiciones anaeróbicas a 37°C durante 24 h. Examinar los tubos del medio de lactosa-gelatina para la presencia de gas y un color amarillo (debido a la producción de ácido) indicando la fermentación de lactosa. Enfriar los tubos durante 1 h a 5°C y chequear la licuación de gelatina. Si el medio ha solidificado, reincubar durante 24 h adicionales y repetir nuevamente para la licuación de la gelatina.

3.5.5. Interpretación

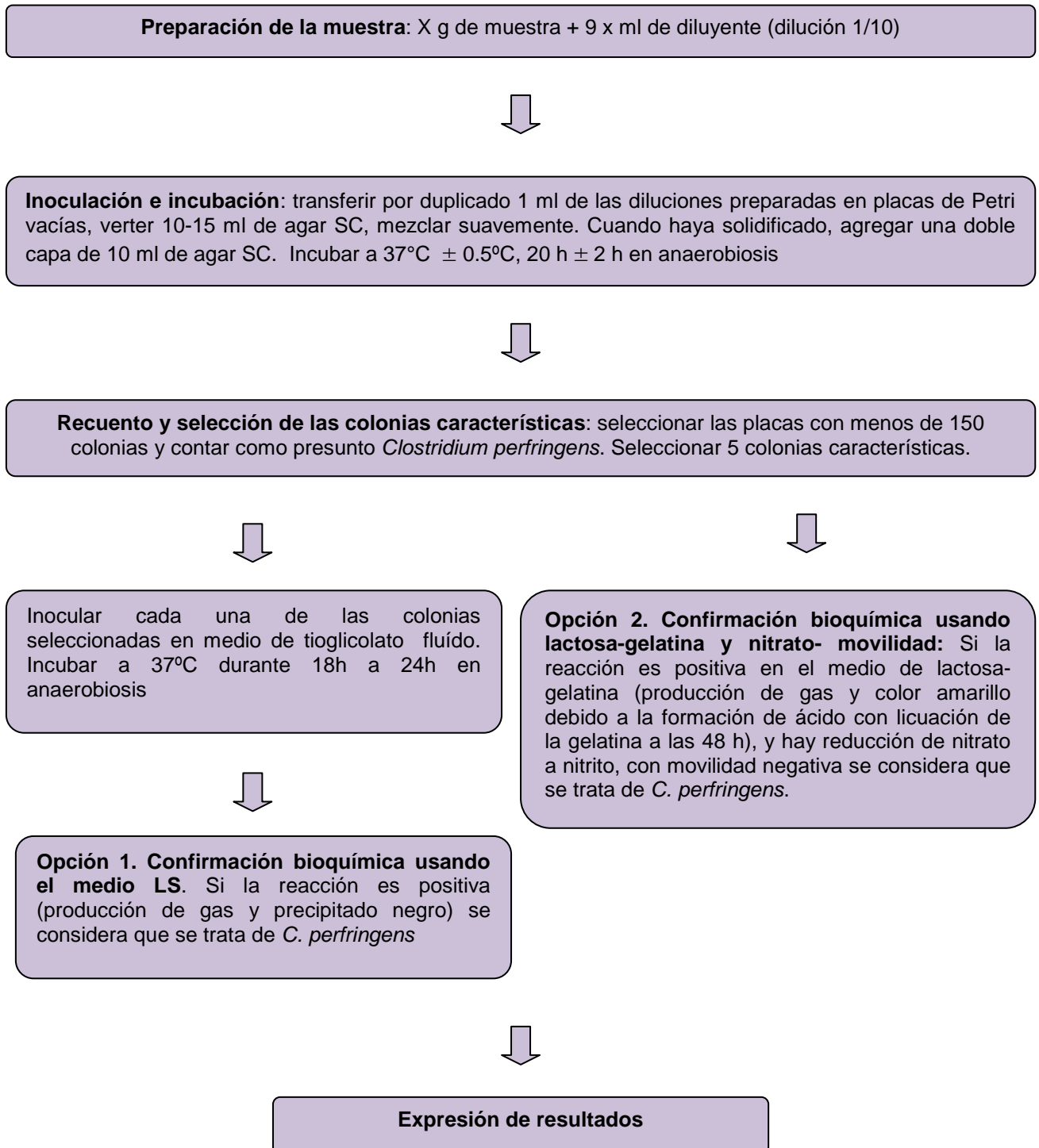
Bacterias que producen colonias negras en el medio de SC, son no-móviles, usualmente reducen nitrato a nitrito, producen ácido y gas de lactosa, y licuan gelatina en 48 h, se consideran *C. perfringens*. Cultivos que muestran una reacción débil para nitritos (color rosa) deberían ser descartados, ya que *C. perfringens* da una reacción intensa e inmediata.

3.5.6. Expresión de resultados

Se informa recuento de *Clostridium perfringens* en la porción de muestra analizada (por gramos o mililitros para muestras líquidas). Ver Anexo 3: Cálculo y expresión de resultados

4. ANEXOS

ANEXO 1: Diagrama de flujo del procedimiento para recuento de *Clostridium perfringens*



ANEXO 2: Medios de cultivos y reactivos**1. Diluyentes****1. 1. Agua Peptona Bufferada (BPW)**

Digesto enzimático de tejidos animales	10.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Fosfato disódico mono ácido dodecahidratado (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O)	9.0 g
Fosfato monopotásico diácido (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.

1.2. Solución salina peptonada

Digesto enzimático de caseína	1.0 g
Cloruro de sodio	8.5 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. Agar sulfito-cicloserina (SC)**2.1. Agar sulfito-cicloserina base**

Digestivo enzimático de proteína	15.0 g
Digestivo enzimático de soja	5.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Disulfito disódico (Na ₂ S ₂ O ₅), anhidro	1.0 g
Citrato férrico amónico ^(a)	1.0 g
Agar	9.0 a 18.0 g*
Agua destilada	1000 ml

^(a) este reactivo debe contener al menos 15 % (fracción en peso) de hierro

*dependiendo de la potencia gelificante del agar

Disolver los componentes en agua hasta ebullición. Ajustar el pH para que después de la esterilización sea de 7.6 ± 0.2 a 25°C. Distribuir en frascos o botellas de capacidad adecuada. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Descartar a las 2 semanas de preparado.

2.2. Solución de D-cicloserina

D-cicloserina (a)	4.0 g
Agua destilada	100 ml

(a) usar solamente el polvo en estado cristalino blanco
 Disolver la D-cicloserina en agua destilada, mezclar y esterilizar por filtración. Conservar a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, descartar a las 4 semanas después de preparada.

2.3. Medio completo

Inmediatamente antes de usar, por cada 100 ml del medio base fundido y enfriado a $44^{\circ} - 47^{\circ} \text{C}$, añadir 1 ml de la solución de D-cicloserina.

3. Medio de tioglicolato fluído

Digesto enzimático de caseína	15.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Cloruro de Sodio	2.5 g
D-glucosa	5.5 g
L-cisteína	0.5 g
Tioglicolato de sodio (mercaptoacetato)	0.5 g
Agar	0.5 a 2.0 g*
Resazurina 0.001 g	0.001 g
Agua destilada	1000 ml

*dependiendo de la potencia gelificante del agar

Disolver los componentes en agua destilada llevando a ebullición. Ajustar el pH para que después de la esterilización sea de 7.1 ± 0.2 a 25°C . Dispensar en porciones de 10 ml en tubos. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Antes de usar el medio debe ser desaireado.

4. Medio de lactosa sulfito (LS) (opción 1)

4.1. Medio base

Digesto enzimático de caseína	5.0 g
Extracto de levadura	2.5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	2.5 g
Lactosa	10.0 g
Clorhidrato de L-cisteína	0.3 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada llevando a ebullición si fuese necesario. Ajustar el pH para que después de la esterilización sea de 7.1 ± 0.2 a 25°C . Dispensar en porciones de 8 ml en tubos con campanitas de Durham. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Conservar a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, descartar a las 4 semanas después de preparado.

4.2. Solución de disulfito disódico

Disulfito disódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) anhidro	1.2 g
Agua	100 ml

Disolver el disulfito disódico en agua y esterilizar la solución por filtración. Usar en el día.

4.3. Solución de citrato férrico amónico

Citrato de hierro (III) amónico	1.0 g
Agua	100 ml

Disolver el citrato férrico amónico en agua y esterilizar la solución por filtración. Usar en el día.

4.4. Medio completo

Si el medio no se usa el día de la preparación, antes de usar desairearlo completamente por calentamiento y enfriado rápido. Si el medio está en tubos con tapa a rosca aflojarlas antes del calentamiento y ajustarlas antes de enfriar. Entonces agregar 0.5 ml de la solución de disulfito disódico (4.2) y 0.5 ml de la solución de Citrato de hierro (III) amónico (4.3) por cada 8 ml del medio base. Usar el medio completo en el día.

5. Medio para nitrato movilidad (opción 2)

Digesto enzimático de caseína	5.0 g
Extracto de carne	3.0 g
Nitrato de potasio	1.0 g
Galactosa	5.0 g
Glicerol	5.0 g
Orto-fosfato ácido disódico (Na_2HPO_4)	2.5 g
Agar	1.0 a 5.0 g*
Agua destilada	1000 ml

*dependiendo de la firmeza del agar

Disolver los componentes en agua, por ebullición. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor después de la esterilización de 7.3 ± 0.2 a 25°C . Fraccionar 10 ml del medio en tubos. Esterilizar a 121°C

durante 15 minutos. Si no se usa el día de la preparación, mantener a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Justo antes de usar, calentar en baño hirviente durante 15 minutos y enfriar rápidamente a temperatura ambiente. Descartar a las 4 semanas después de preparado.

6. Reactivos para la detección de nitrito

6.1. Solución de ácido sulfónico 5-amino-2-naftalen (5-2-ANSA)

Disolver 0.1 g de 5-2-ANSA en 100 ml de solución ácido acético al 15 % (en volumen). Filtrar a través de papel de filtro. Almacenar en botellas color caramelo (preferentemente con sistema de gotero) a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

6.2. Solución de ácido sulfanílico

Disolver 0.4 g de ácido sulfanílico en 100 ml de solución ácido acético al 15 % (en volumen). Filtrar a través de papel de filtro. Almacenar en botellas marrones (preferentemente con sistema de gotero) a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

6.3. Preparación del reactivo completo

Mezclar partes iguales de la soluciones 6.1. y 6.2. justo antes de usar. Descartar inmediatamente el reactivo no usado.

6.4 Zinc en polvo

7. Medio de lactosa-gelatina

Digesto enzimático de caseína	15.0 g
Extracto de levadura	10.0 g
Lactosa	10.0 g
Gelatina	120.0 g
Rojo fenol	0.05 g
Agua	1000 ml

Disolver los componentes en agua, excepto la lactosa y el rojo fenol. Ajustar el pH para que después de la esterilización sea de 7.5 ± 0.2 a 25°C . Agregar la lactosa y el rojo fenol, dispensar en porciones de 10 ml en tubos y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Si no se usa en el día, mantener en heladera a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Justo antes de usar, calentar en baño hirviente o con vapor por 15 minutos, entonces enfriar rápidamente a la temperatura de incubación. Descartar a las 3 semanas de la preparación.

ANEXO 3: Cálculo y expresión de los resultados (ISO 7218:2007)

1. Método de cálculo

Para que un resultado sea válido, se suele considerar necesario que el recuento de colonias se realice al menos en una placa que contenga un mínimo de 10 colonias sospechosas.

2. Método de cálculo después de la confirmación

2.1. En este método donde se requiere de una confirmación para el recuento, se identifica un número de colonias sospechosas (A) que se someten a confirmación (ver 3.5.4.1). Tras la confirmación se calcula el número de colonias de cada placa (a) que cumplen con los criterios de la confirmación, utilizando la ecuación (1):

$$1. \quad a = \frac{b}{A} \times C$$

Donde:

- b : es el número de colonias que cumplen con los criterios de confirmación dentro de las colonias sospechosas A que se someten a confirmación
- C : es el número total de colonias sospechosas contadas en cada placa

2.2. El resultado calculado se aproxima al número entero más próximo. Cuando se realiza esta operación, si la primera cifra decimal es inferior a 5, no se modifica la cifra anterior; si la primera cifra decimal es igual o superior a 5, la cifra anterior se incrementa en una unidad

2.3. El número de microorganismos N presentes en la muestra de análisis se calcula reemplazando ΣC por Σa en la ecuación general

$$N = \frac{\Sigma C}{V \times 1,1 \times d} \quad \text{quedando} \quad N = \frac{\Sigma a}{V \times 1,1 \times d}$$

Donde:

- V : es el volumen de inóculo utilizado en cada placa, en mililitros
- d : es la dilución correspondiente a la primera dilución elegida ($d = 1$ cuando se utiliza el producto líquido sin diluir)

2.4. El resultado calculado se redondea a dos cifras significativas. Cuando se realiza esta operación, si la tercera cifra es inferior a 5, no

se modifica la cifra anterior; si la tercera cifra es igual o superior a 5, la cifra anterior se incrementa en una unidad.

Preferiblemente el resultado se expresa como un número entre 1.0 y 9.9 multiplicado por la potencia de 10 adecuada, o como un número entero con dos cifras significativas.

El resultado se expresa como número de microorganismos N por mililitro (para productos líquidos) o por gramo (para el resto de productos)

EJEMPLO: El recuento ha proporcionado los siguientes resultados

- Para la primera dilución escogida (10^{-3}): 66 colonias
- Para la segunda dilución escogida (10^{-4}): 4 colonias

Realizando el análisis de las colonias escogidas:

- de las 66 colonias, se analizaron 8, de las que 6 cumplieron los criterios, por consiguiente $a = 50$
- de las 4 colonias, las 4 cumplieron los criterios; por consiguiente $a = 4$

$$N = \frac{\sum a}{V \times 1,1 \times d} = \frac{50 + 4}{1 \times 1,1 \times 10^{-3}} = \frac{54}{1,1 \times 10^{-3}} = 49090$$

Redondeando el resultado como se indicó en 2.4, el número de microorganismos es de 49000 o $4,9 \times 10^4$ por mililitro o por gramo de producto.

3. Método de cálculo para recuento bajo

3.1. Si la placa contiene menos de 10 colonias, pero como mínimo 4, el resultado se calcula como lo indicado en 2.3 y se expresa como número estimado de microorganismos x por mililitro (productos líquidos) o por gramo (resto de productos)

3.2. Si el resultado total oscila entre 1 y 3 colonias, la precisión del análisis es demasiado baja y el resultado debe expresarse como:

"Hay microorganismos presentes, pero a un nivel inferior a ($4 \times d$) por gramo o ml"

4. Caso en el que la placa (muestra para análisis, suspensión inicial o primera dilución) no contiene colonias

Si la placa que contiene la muestra para análisis (productos líquidos) o la suspensión inicial (restos de productos), o la primera dilución

inoculada o escogida no contiene colonias, el resultado se expresa de la siguiente manera:

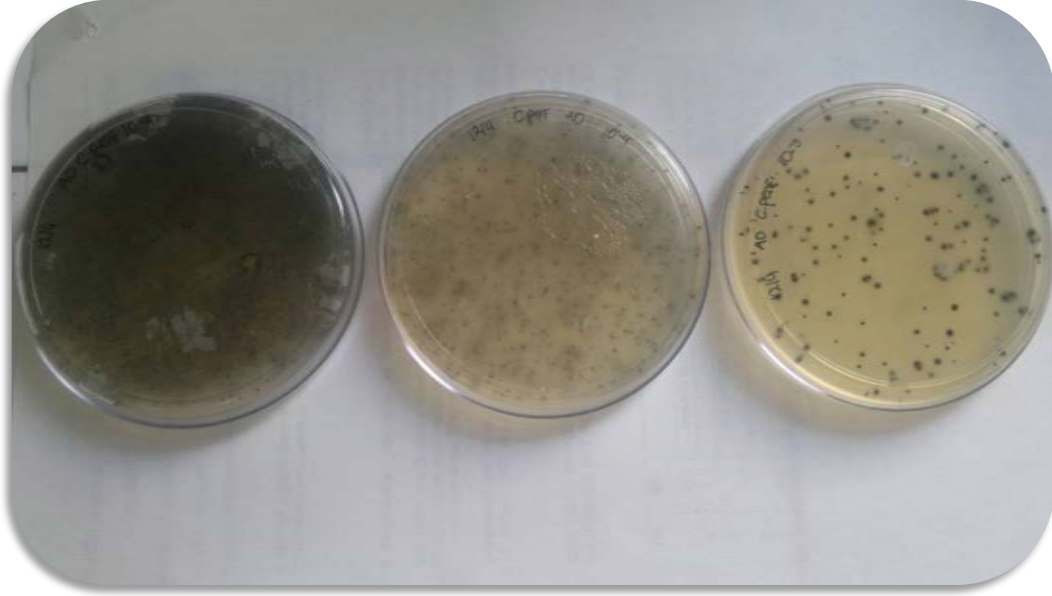
“Menos de $\frac{1}{d}$ microorganismos por mililitro” (productos líquidos) o

“menos de $\frac{1}{d}$ microorganismos por gramo” (restos de producto)

NOTA: para recuento de casos especiales ver norma ISO 7218:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs. General requirements and guidance for microbiological examinations.

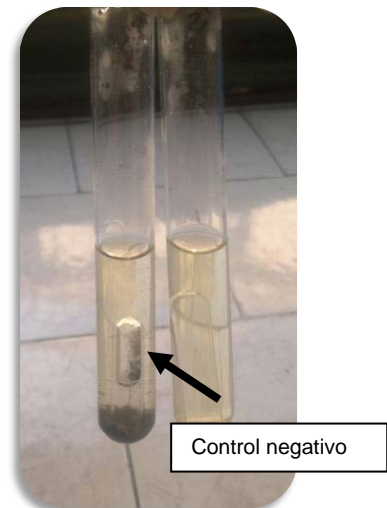
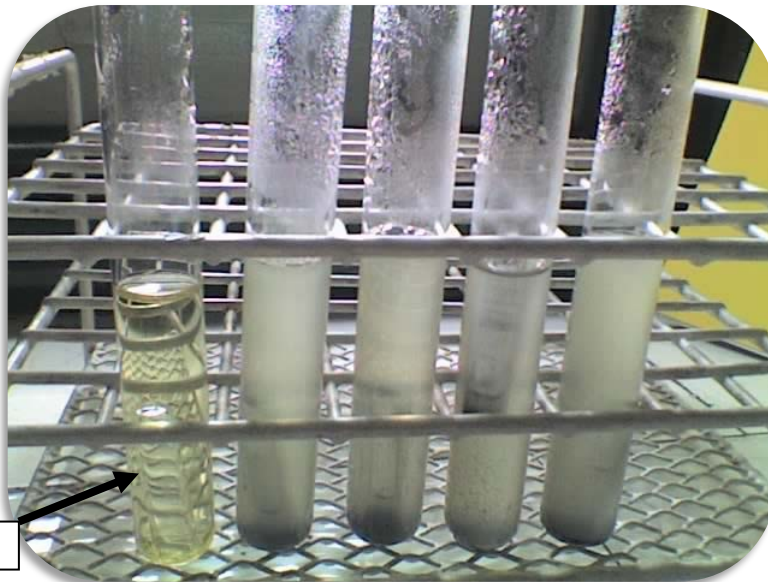
ANEXO 4: FOTOS

1. Agar sulfito-cicloserina



Clostridium perfringens: Siembra de diluciones decimales sucesivas. Colonias características negras (precipitado negro, causado por la reducción de sulfito a sulfuro)

2. Medio lactosa sulfito



Clostridium perfringen: producción de gas y precipitado negro en medio lactosa sulfito

3. Caldo tioglicolato



Clostridium perfringens: en caldo tioglicolato

5. REFERENCIAS

(1) International Standard. ISO 7937: 2004 (E). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens* - Colony-count technique. Third edition, 2004-08-15

(2) International Standard. ISO 6887 – 1. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. First edition, 1999-02-15.

(3) International Standard. ISO 7218: 2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs. General requirements and guidance for microbiological examinations. Third edition, 2007-08-15.

NOTA: Las siguientes normas de referencias son indispensables para la aplicación del presente procedimiento. Para cada norma de referencia debe aplicarse la edición citada, en caso de no especificarse la misma, deberá aplicarse la última edición (incluyendo cualquier modificación).

ISO 6887-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

ISO 6887-2, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products

ISO 6887-3, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products

ISO 6887-4, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products meat and meat products, and fish and fishery products

ISO 7218, Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations.

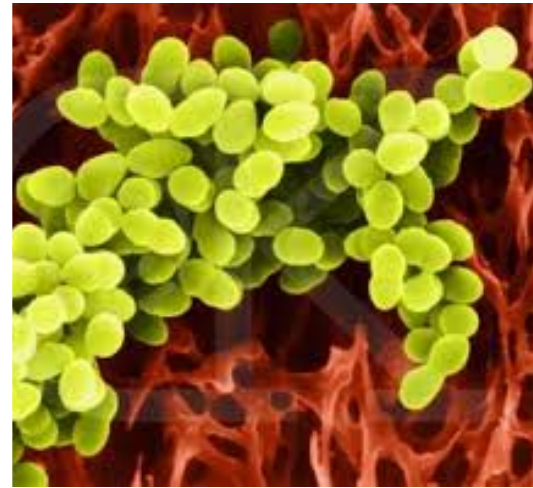
ISO 6887-5, Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products

ISO/TS 11 33-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 1 : General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory

ISO/TS 11 133-2:2003, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media

A series of 12 horizontal dashed lines spanning the width of the page, providing a template for writing.

Staphylococcus aureus



Staphylococcus aureus en alimentos

1. Generalidades

Género *Staphylococcus*

El género *Staphylococcus* pertenece a la familia Micrococcaceae, los miembros de éste género se caracterizan por ser cocos gram positivos de 0.5 – 1.5 μm de diámetro, catalasa positiva, que se encuentran aislados, en pares, tétradas o formando racimos irregulares (término derivado del griego *staphylé*: racimo de uva). Son inmóviles, anaerobios facultativos, no formadores de esporos, generalmente no capsulados o con limitada formación de cápsula. ²

El género *Staphylococcus* incluye al menos 40 especies. De éstos, nueve, tienen dos subespecies y uno, tiene tres subespecies (Harris L.G, Foster S.J, Richards S. G. (2002). La mayoría son inofensivos y pueden residir normalmente en la piel y las membranas mucosas de los seres humanos y otros organismos ⁽¹⁾.

De éstas especies, *Staphylococcus aureus subespecie aureus* o normalmente llamado *Staphylococcus aureus* es el principal responsable de la intoxicación alimentaria estafilocócica.

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus conocido como estafilococo aureus, o comúnmente estafilococo dorado, es una bacteria anaerobia facultativa, grampositiva, productora de coagulasa, catalasa positiva, inmóvil y no esporulada, que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo, estimándose que una de cada tres personas se hallan colonizadas, aunque no infectadas, por ella.

Puede producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas relativamente benignas, tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsias, endocarditis o neumonía. Además, puede afectar al aparato gastrointestinal por la ingestión de alimentos contaminados con la enterotoxina estafilocócica secretada por la bacteria.

2. Reservorio y vías de transmisión

El hombre es el principal reservorio de *S. aureus*, se encuentra en la piel y en las vías respiratorias superiores (nasofaringe).

La contaminación de los alimentos puede ocurrir desde los operadores y por contaminación cruzada por el uso de utensilios contaminados o materias primas contaminadas.

En el caso de contaminación directa desde el operador puede ocurrir por contacto directo con lesiones en la piel o por microgotas salivales generadas en estornudos o tos de los operadores.

Los animales también son una fuente importante de infección; se destaca la mastitis en los bovinos y ovinos que puede determinar la contaminación de la leche ⁽²⁾. La presencia de este microorganismo en cuero, plumas y piel de animales es habitual, por lo tanto la contaminación de las carcasas de los animales a veces es inevitable.

Muy diversos alimentos han sido la causa de la intoxicación alimentaria estafilocócica. En lugar destacado en términos de frecuencia han de citarse la carne de mamíferos y aves cocinadas, leche y sus derivados como queso, crema, yogur y helados, productos de pastelería rellenos de crema, ensaladas, alimentos cortados en rebanadas, sándwiches y otros tipos de alimentos que llevan manipulación por parte del operador. ⁽³⁾

3. Patogenia de la intoxicación

S.aureus produce una gama especialmente amplia de sustancias (agresinas y exotoxinas) asociadas con el grado de infección y con la enfermedad. Varían desde componentes de la pared celular, por ejemplo ácidos teicoicos, hasta una amplia gama de exoenzimas que incluyen estafiloquinasa, hialuronidasas, fosfatasas, coagulasas, catalasas, proteasas, nucleasas y lipasas, leucocidinas y hemolisinas y, por último, pero de ningún modo menos importantes, las enterotoxinas que causan la intoxicación alimentaria.

Los síntomas de la intoxicación por *S. aureus* se deben a diversos polipéptidos antigénicamente distintos que actúan como toxinas eméticas, las enterotoxinas estafilocócicas (SE). Estas toxinas son liberadas al propio alimento por ciertas cepas de *S.aureus* ⁽³⁾.

Hasta hace unos años, se reconocían 5 tipos de enterotoxinas por la técnica de inmunodifusión: SEA, SEB, SEC, SED y SEE. Posteriormente se identificaron 13 nuevos tipos, reconociéndose en la actualidad 20 tipos de SE ⁽⁴⁾.

Los estafilococos pueden multiplicarse exponencialmente a temperaturas entre 6.7°C y 45.5°C. La enterotoxina es producida por

las células durante o inmediatamente después de la multiplicación. Según Gilbert y colaboradores, se precisa la presencia actual o en un momento anterior de la vida del alimento de un número elevado (generalmente más de 10^6 ufc/g) para producir la cantidad suficiente de toxina que origine síntomas en el consumidor del alimento. Con todo, la cantidad de enterotoxina A necesaria para determinar síntomas de intoxicación en el hombre es sólo de 0,1 – 1 $\mu\text{g} / \text{Kg}$.⁽³⁾

Las SE originan el reflejo emético por estimulación vagal de la mucosa gástrica y los nervios simpáticos, produciendo la activación del centro del vómito en el tronco encefálico. La diarrea inducida por SE se debe a la disminución de la absorción del agua en el intestino y al aumento simultáneo de la secreción de agua y sales minerales desde las células intestinales en un mecanismo mediado por AMP – cíclico⁽⁴⁾.

Estabilidad y termoresistencia de las enterotoxinas estafilocócicas

Las enterotoxinas de *S.aureus* poseen una elevada estabilidad, ya que resisten la irradiación y la actividad de enzimas proteolíticas como la pepsina y la tripsina. Las SE son termoestables, presentan elevada resistencia a los tratamientos térmicos habituales, como por ejemplo la pasteurización a 72°C durante 30 segundos y a 100°C durante 30 minutos. Se inactivan a temperatura de esterilización a 115°C.

Los alimentos procesados o tratados en los que se ha destruido una elevada población de estafilococos por calentamiento pueden, no obstante, producir intoxicación alimentaria debido a la termoresistencia de las SE. De este modo puede encontrarse en alimentos tratados térmicamente toxina en presencia de un pequeño número e incluso en ausencia de estafilococos viables.

Por ejemplo los alimentos fluidos, particularmente la leche, si se mantiene algunas horas a temperaturas adecuadas para el crecimiento de los estafilococos, puede permitir la producción de cantidades significativas de SE. La subsiguiente pasteurización y un proceso de desecado inactivarán todos o la mayoría de los estafilococos, pero permanecerán sin afectarse las SE por su termoresistencia. De hecho se han comprobado con absoluta evidencia brotes de intoxicación estafilocócica producidos por leche en polvo reconstituida⁽³⁾.

4. Manifestaciones clínica

La intoxicación alimentaria estafilocócica es un síndrome caracterizado por náuseas, vómitos, diarrea, malestar y debilidad

general. Los síntomas comienzan a manifestarse entre 1 a 6 horas (y más generalmente de 2 a 4 horas) después de consumido el alimento. Aunque la enfermedad es raramente mortal, los casos graves pueden complicarse, presentándose a veces deshidratación y shock. El enfermo suele reponerse en unas 24 horas, aunque en algún caso la recuperación puede durar varios días ⁽³⁾.

5. Diagnóstico

Habitualmente el diagnóstico es clínico - epidemiológico

- Epidemiológico: (tipo de alimento, período de incubación, otros casos).
- Clínico: (vómitos, diarrea líquida, dolor cólico abdominal).
- Por métodos auxiliares: rescate de *S. aureus* en cultivo de muestras de heces obtenidas dentro de las 48 horas y del alimento (10^5 UFC/g).

6. Tratamiento

La intoxicación alimenticia por estafilococo se trata manejando cualquier complicación hasta que desaparezca. La deshidratación causada por la diarrea y el vómito es la complicación más común. El tratamiento es sintomático y de sostén (aporte hidroelectrolítico adecuado y dieta astringente).

7. Prevención

La intoxicación estafilocócica se puede evitar impidiendo el crecimiento de *S. aureus* enterotoxigénicos en los alimentos. Para ello es necesario respetar las Buenas Prácticas de Higiene a lo largo de la cadena alimentaria, especialmente en el momento de preparación de las comidas.

Se puede minimizar extraordinariamente la contaminación de los alimentos por *S. aureus* de origen humano, apartando de la manipulación y preparación de alimentos a personas infectadas o enfermas.

La contaminación de los alimentos por *S. aureus* de origen animal se reduce controlando las mastitis. Además, es necesario evitar en el matadero las contaminaciones cruzadas entre piel y canales, así como en el hogar y establecimientos de elaboración de comidas (catering, comedores, etc.) entre alimentos crudos y cocidos

Los *S. aureus* del ambiente (aparatos, superficies, utensilios de cocina, etc.) se eliminan con buenas prácticas de limpieza e higiene

Además de estas medidas preventivas es preciso:

- Destruir los *S. aureus* por el calor antes que se multipliquen (pasteurización, cocción)
- Frenar su multiplicación llevando rápidamente los alimentos a temperaturas inferior a 4°C para su conservación.
- Respetar la cadena de frío, es el punto clave para la prevención del crecimiento de *S. aureus*

REFERENCIAS

- (1) Harris L.G, Foster S.J, Richards S. G. (2002). "An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review". *European cells and materials* 4: 39–60. [PMID 14562246](#).
- (2) <http://publicaciones.ops.org.ar/publicaciones/publicaciones%20virtuales/libroETAs/modulo2/modulo2n.html>
- (3) ICMSF. Microorganismos de los Alimentos I. Editorial Acribia.
- (4) Detección, recuento y caracterización fenotípica y genotípica de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico a partir de alimentos. Servicio de Fisiopatogenia, Depto. de Bacteriología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI – ANLIS)

Recuento de Estafilococos coagulasa positiva en muestras de alimentos

Técnica de recuento en placa

Procedimiento según
International Standard Organization ISO 6888-1: 1999

1. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar el recuento y la confirmación de estafilococos coagulasa positiva (*Staphylococcus aureus* y otras especies), por la técnica de recuento de colonias en placa en muestras de alimentos.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica para realizar el recuento y la confirmación de estafilococos coagulasa positiva (*Staphylococcus aureus* y otras especies) por técnica de recuento de colonias en placa en muestras de alimentos.

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.

Normas de referencia: Para la aplicación del presente procedimiento son indispensables las normas citadas en el punto 5. Referencias

3. DESARROLLO

3.1. Definiciones y abreviaturas

Para el propósito de este documento

- Estafilococo coagulasa positiva: bacteria que forma colonia característica y/o no característica en la superficie del medio agar Baird Parker, y que presenta una reacción de coagulasa positiva cuando la determinación es llevada a cabo por la presente técnica.
- Recuento de estafilococo coagulasa positiva: determinación del número de estafilococos coagulasa positiva por mililitro o gramo de muestra cuando la determinación es llevada a cabo por la presente técnica.

3.2. Principio (ver ANEXO 1)

El método está basado en las siguientes etapas:

3.2.1. Inoculación en la superficie de un medio de cultivo sólido selectivo por duplicado, con una cantidad específica de la muestra si el producto es líquido o con una cantidad específica de la dilución inicial en caso de otros productos. 3.2.2. Inoculación bajo las mismas condiciones de la dilución inicial o de las diluciones decimales utilizando dos placas por cada dilución.

3.2.2. Incubación a 35°C ó 37°C (la temperatura es acordada entre las partes interesadas y es indicada en el informe de resultados) y observación de las placas a las 24 h y 48 h.

3.2.3. Cálculo del número de estafilococos coagulasa positiva por mililitro o por gramo de muestra a partir del número de colonias típicas y/o atípicas obtenidas en una determinada dilución y confirmadas por la prueba de la coagulasa.

3.3. Medios de cultivo, soluciones, reactivos para propiedades bioquímicas y equipos (ver ANEXO 2)

3.3.1. Agua peptona bufferada (BPW)

3.3.2. Solución salina peptonada (SFP)

3.3.3. Agar Baird Parker

3.3.4. Solución de telurito de potasio al 1 %

3.3.5. Solución de yema de huevo (aproximadamente al 20% o de acuerdo a las instrucciones del fabricante)

3.3.6. Solución de sulfametazina (sulfametazina, sulfadimidina)

3.3.7. Caldo cerebro, corazón, infusión (caldo BHI)

3.3.8. Plasma de conejo

3.3.9. Estufa de esterilización

3.3.10. Autoclave

3.3.11. Estufa de incubación: 35°C ± 1°C o 37°C ± 1°C

3.3.12. Baño de agua o aparato similar capaz de mantener la temperatura a 47°C ± 2°C.

3.3.13. Peachímetro de exactitud 0.01 a 25°C ± 1°C.

3.3.14. Pipetas de 1 ml, 2 ml y 10 ml de capacidad, graduadas en intervalos de 0.1, 0.1 y 0.5 ml respectivamente

3.3.15. Ansas de platino-iridio o níquel-cromo de aprox. 3 mm de diámetro y de punción del mismo material, o equivalentes estériles descartables.

3.3.16. Tubos de ensayo, botellas o frascos de capacidad apropiada, en particular de 16 mm x 160 mm y tubos de hemólisis.

3.3.17. Placas de Petri de vidrio o plástico de 90 a 100 mm de diámetro y de 140 mm de diámetro.

3.3.18. Espátula de Drigalsky

3.4. Muestreo

El plan de muestreo a utilizar está fuera del alcance de esta metodología.

3.5. Procedimiento

3.5.1. Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones (ISO 6887-1:1999)

NOTA: Para este punto referir a la norma ISO 6887 – 1 y las normas específicas para el alimento en cuestión. (Ver punto 5. Referencias)

3.5.1.1. Suspensión inicial

En un frasco estéril o bolsa de plástico estéril pesar con una incertidumbre de medición de $\pm 5\%$ una cantidad de masa x g o medir con una incertidumbre de medición de $\pm 5\%$ un volumen x ml (como mínimo 10 g ó 10 ml a menos que se indique otra cantidad).

Agregar una cantidad del diluyente igual a $9x$ g ó $9x$ ml (dilución 1/10) y homogeneizar entre 1 minuto a 3 minutos dependiendo del alimento.

Para evitar daños de los microorganismos por cambios bruscos de temperatura, procurar que la temperatura del diluyente y la ambiental sean similares.

NOTA: En algunos casos, particularmente para los productos muy viscosos o muy espesos, podría ser necesario agregar mayor cantidad de diluyente, lo cual debe tenerse en cuenta en las operaciones subsiguientes y / o en la expresión de resultados.

3.5.1.2. Diluciones decimales

Transferir con una pipeta 1ml (con una incertidumbre de medición de $\pm 5\%$) de la suspensión inicial en un tubo con 9 ml del diluyente estéril.

Para una óptima precisión no introducir la pipeta más de 1 cm en la suspensión inicial y evitar el contacto entre la pipeta que contiene el inóculo y el diluyente estéril.

Mezclar utilizando preferentemente un agitador mecánico, durante 5 a 10 segundos para obtener la dilución 10^{-2} .

Si es necesario repetir esta operación a partir de la dilución 10^{-2} y diluciones sucesivas, utilizar en cada operación una nueva pipeta estéril para obtener las siguientes diluciones (10^{-3} , 10^{-4} , etc.). Se realizan las diluciones que sean necesarias para obtener un número apropiado de microorganismos para realizar el recuento. (Ver 3.5.3.)

3.5.1.3. Duración del procedimiento

El tiempo transcurrido, entre el final de la preparación de la suspensión inicial y el instante en que el inóculo entra en contacto con el medio de cultivo, no debe superar los 45 minutos. Mientras que el lapso de tiempo límite entre la preparación de la suspensión inicial y el comienzo de la preparación de las diluciones decimales sucesivas es de 30 minutos.

NOTA: si la temperatura ambiente del laboratorio es muy alta estos dos lapsos de tiempo deben ser reducidos.

3.5.2. Inoculación e incubación

3.5.2.1. Transferir 0.1 ml de la muestra si el producto es líquido ó 0.1 ml de la suspensión inicial (dilución 1/10) en caso de otros productos y 0.1 ml de las diluciones sucesivas preparadas según 3.5.1.2. por duplicado a placas con agar Baird Parker.

3.5.2.2. Si para ciertos productos es necesario realizar un recuento de un número bajo de estafilococos coagulasa positiva, el límite de detección puede ser elevado por un factor de 10 sembrando 1 ml de la muestra si el producto es líquido ó 1 ml de la suspensión inicial (dilución 1/10) en caso de otros productos, y 1 ml de las diluciones sucesivas preparadas según 3.5.1.2. en una placa de Petri grande (140 mm) con agar Baird Parker o en tres placas de Petri de 90 mm con agar Baird Parker. En ambos casos, sembrar por duplicado utilizando 2 placas grandes o 6 placas de Petri de 90 mm.

3.5.2.3. Cuidadosamente dispersar el inóculo sobre la superficie del agar con una espátula de Drigalsky lo más rápido posible, tratando de no tocar los bordes de la placa. Dejar secar las placas sin invertir, con la tapa puesta durante 15 minutos a temperatura ambiente.

3.5.2.4. Invertir las placas sembradas e incubar a 35°C ó 37°C (la temperatura es acordada entre las partes interesadas y es indicada en el informe de resultados) durante 24 h \pm 2 h y luego 24 h \pm 2 h adicionales.

3.5.3. Recuento y selección de las colonias

3.5.3.1. Después de la incubación de 24 h \pm 2 h marcar en el fondo de la placa la posición de cualquier colonia típica presente. (Ver NOTA 1)

3.5.3.2. Incubar todas las placas a 35°C ó 37°C (la temperatura es acordada entre las partes interesadas y es indicada en el informe de resultados) durante 24 h \pm 2 h adicionales y marcar todas las colonias típicas nuevas. También marcar las colonias atípicas presentes. (Ver NOTA 2).

Tener en cuenta para el recuento sólo las placas que contienen como máximo 300 colonias totales con 150 colonias típicas y/o atípicas hasta dos diluciones sucesivas. Una de las placas debe contener al menos 15 colonias.

3.5.3.3. Seleccionar para la confirmación un número *A* de colonias (en general 5 colonias típicas si sólo hay colonias típicas o 5 colonias atípicas si sólo hay colonias atípicas o 5 colonias típicas y 5 colonias atípicas si se encuentran presente ambos tipos en cada placa).

3.5.3.4. Si en la placa hay menos de 15 colonias típicas y/o atípicas inocular con el producto líquido sin diluir o con la más baja dilución de los otros productos. Es posible realizar un recuento estimado como se describe en 3.5.5.2.

NOTA 1: Las colonias típicas son negras o grises, con brillo y convexas (de 1 mm a 1.5 mm de diámetro después de una incubación de 24 h y de 1.5 mm a 2.5 mm de diámetro después de

una incubación de 48 h) y rodeadas por una zona de clarificación que puede ser parcialmente opaca. Después de una incubación de por lo menos 24 h puede aparecer un anillo opalescente de precipitación inmediatamente alrededor de la colonia.

Las colonias atípicas son del mismo tamaño que las típicas y pueden presentar una de las siguientes morfologías:

- Colonias negras con brillo, con o sin un fino borde blanco, la zona de clarificación está ausente o es vagamente visible y el anillo opalescente ausente o poco visible.
- Colonias grises sin zona de clarificación

NOTA 2: las colonias atípicas son formadas principalmente por cepas de estafilococos coagulasa positiva presentes por ejemplo en productos lácteos, camarones y menudencias. Con menos frecuencia son formadas por cepas de estafilococos coagulasa positiva presentes en otros productos.

NOTA 3: algunas bacterias pertenecientes a otros géneros pueden dar colonias de apariencia similar a las de estafilococos pero realizando una observación microscópica con coloración de Gram antes de la confirmación se puede realizar una separación de géneros.

NOTA 4: Las colonias restantes que pueden estar presentes en la placa y que no presentan apariencia de colonias típicas (NOTA 1) o atípicas (NOTA 2) son consideradas como flora acompañante.

3.5.3.5. Si se realizó un inóculo de 1 ml en tres placas (ver 3.5.2.2.) considerar esas placas como una en los subsiguientes procedimientos de recuento y confirmación.

3.5.3.6. Para realizar un recuento estimativo de un bajo número de estafilococos coagulasa positiva retener todas las placas que contienen colonias típicas y atípicas, seleccionar todas las colonias para la confirmación dentro de los límites establecidos arriba (ver 3.5.5.2.)

3.5.4. Confirmación: prueba de la coagulasa

3.5.4.1. De la superficie de cada colonia seleccionada remover un inóculo con ansa aguja y transferir a un tubo con caldo cerebro corazón infusión (caldo BHI), incubar a 35°C ó 37°C durante 24 h ± 2 h.

3.5.4.2. Asépticamente agregar 0.1 ml de cada cultivo en 0.3 ml de plasma de conejo (a menos que otra cantidad sea especificada por el fabricante) en un tubo de hemólisis estéril. Incubar a 35°C ó 37°C (la temperatura es acordada entre las partes interesadas y es indicada en el informe de resultados)

3.5.4.3. Inclinando el tubo observar la formación de coágulo después de 4 h a 6 h de incubación. Si la prueba es negativa reexaminar

después de 24 h de incubación o examinar en el tiempo de incubación especificado por el fabricante.

3.5.4.4. Considerar un resultado positivo si el volumen del coágulo formado ocupa más de la mitad del volumen del líquido original.

3.5.4.5. Como control negativo para cada lote de plasma agregar 0.1 ml de caldo BHI estéril a 0.3 ml de plasma de conejo e incubar sin inoculación. Para que la prueba sea válida el control negativo no debe mostrar signos de coagulación.

3.5.5. Expresión de resultados

3.5.5.1. Caso general

3.5.5.1.1. Cálculo del número a de estafilococos coagulasa positiva identificados por cada placa seleccionada:

Calcular para cada una de las placas seleccionadas el número a de estafilococos coagulasa positiva identificados de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$a = \frac{b_c}{A_c} \times C_c + \frac{b_{nc}}{A_{nc}} \times C_{nc}$$

Donde:

- A_c : es el número de colonias típicas sometidas a la prueba de la coagulasa
- A_{nc} : es el número de colonias atípicas sometidas a la prueba de la coagulasa
- b_c : es el número de colonias típicas que dieron positiva la prueba de la coagulasa
- b_{nc} : es el número de colonias atípicas que dieron positiva la prueba de la coagulasa
- C_c : es el número de total de colonias típicas que se contaron en la placa
- C_{nc} : es el número de total de colonias atípicas que se contaron en la placa

Redondear a un número entero

3.5.5.1.2. Cálculo del número N de estafilococos coagulasa positiva identificados presentes en la porción de muestra sembrada:

Para las placas que contienen un máximo de 300 colonias con 150 colonias típicas y/o atípicas en dos diluciones consecutivas calcular el número de estafilococos coagulasa positiva para cada placa como se especifica en 3.5.5.1.1 y calcular como un promedio de las dos diluciones sucesivas, el número N de estafilococos coagulasa positiva identificados, presentes en la porción de muestra sembrada, utilizando la siguiente ecuación:

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0.1n_2)d}$$

Donde:

- $\sum a$: es el número de colonias de estafilococos coagulasa positiva identificadas en todas las placas seleccionadas
- V : es el volumen de inóculo en cada placa en mililitros
- n_1 : es el número de placas seleccionadas de la primer dilución
- n_2 : es el número de placas seleccionadas de la segunda dilución
- d : es el factor de dilución correspondiente a la primer dilución seleccionada (la suspensión inicial es una dilución)

Redondear el resultado calculado a 2 cifras significativas.

3.5.5.1.3. Informar el resultado como el número de estafilococos coagulasa positiva por mililitro (productos líquidos) o por gramo (otros productos), expresado como un número entre 1.0 y 9.9 inclusive multiplicado por 10^x donde x es la potencia apropiada de 10.

Ejemplo:

El recuento después de la inoculación con 0.1 ml del producto dio los siguientes resultados:

- Para la primera dilución seleccionada (10^{-2}): 65 colonias típicas y 85 colonias atípicas, no hay colonias atípicas
- Para la segunda dilución seleccionada (10^{-3}): 3 colonias típicas y 7 colonias atípicas, no hay colonias atípicas

Se obtuvieron los siguientes datos:

- De las 65 colonias 5 colonias fueron sometidas a la prueba de la coagulasa y todas dieron un resultado positivo, obteniendo entonces un valor de $a = 65$
- De las 85 colonias 5 colonias fueron sometidas a la prueba de la coagulasa y 3 colonias dieron un resultado positivo, obteniendo entonces un valor de $a = 51$
- De las 3 colonias todas fueron sometidas a la prueba de la coagulasa y 3 colonias dieron un resultado positivo, obteniendo entonces un valor de $a = 3$
- De las 7 colonias 5 colonias fueron sometidas a la prueba de la coagulasa y todas dieron un resultado positivo, obteniendo entonces un valor de $a = 7$

$$N = \frac{65 + 51 + 3 + 7}{0.1(2 + 0.1 \times 2)10^{-2}} = 57272$$

El resultado después de redondear se expresa como: 5.7×10^4

3.5.5.2. Estimación para un recuento bajo.

3.5.5.2.1 Si en dos placas correspondientes a la muestra (productos líquidos) o a la suspensión inicial (otros productos), cada una tiene menos de 15 colonias identificadas, informar el resultado de la siguiente manera:

- a) Para productos líquidos: estimación del número de estafilococos coagulasa positiva por mililitro:

$$N_e = \frac{\sum a}{V \times 2}$$

Donde:

- $\sum a$: es la sumatoria de las colonias de estafilococos coagulasa positiva identificadas (3.5.5.1.1.)
- V : es el volumen sembrado en cada placa

- b) Para otros productos: estimación del número de estafilococos coagulasa positiva por gramo:

$$N_e = \frac{\sum a}{V \times 2 \times d}$$

Donde:

- $\sum a$: es la sumatoria de las colonias de estafilococos coagulasa positiva identificadas (3.5.5.1.1.)
- V : es el volumen sembrado en cada placa
- d : es el factor de dilución de la suspensión

3.5.5.2.2. Si las dos placas correspondientes a la siembra de la muestra (producto líquido) o de la suspensión inicial (otros productos) no contienen colonias de estafilococos coagulasa positiva y si la inoculación ha sido realizada con 0.1 ml de muestra informar el resultado de la siguiente manera:

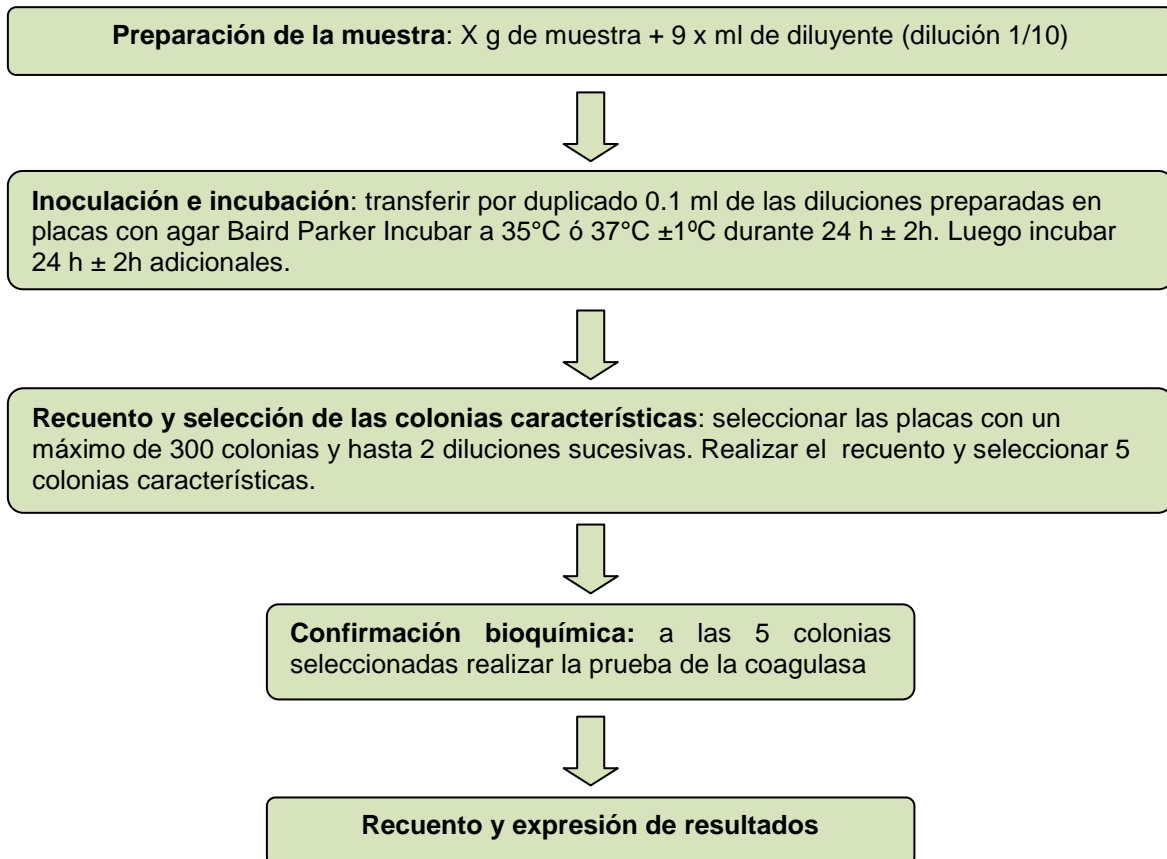
- Menos de 10 estafilococos coagulasa positiva por mililitro (para productos líquidos)
- Menos de $10/d$ estafilococos coagulasa positiva por gramo (para otros productos), donde d es el factor de dilución de la suspensión inicial.

Si la inoculación ha sido realizada con 1 ml de muestra informar el resultado de la siguiente manera:

- Menos de 1 estafilococos coagulasa positiva por mililitro (para productos líquidos)
- Menos de $1/d$ estafilococos coagulasa positiva por gramo (para otros productos), donde d es el factor de dilución de la suspensión inicial.

4. ANEXOS

ANEXO 1: Diagrama de flujo del procedimiento para recuento de estafilococos coagulasa positiva por la técnica de recuento en placa.



ANEXO 2: Medios de cultivos y reactivos

1. Diluyentes

1. 1. Agua Peptona Bufferada (BPW)

Digesto enzimático de tejidos animales	10.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Fosfato disódico mono ácido dodecahidratado (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	9.0 g
Fosfato monopotásico diácido (KH ₂ PO ₄)	1.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua, si es necesario calentar. Ajustar el pH para que luego de la esterilización su valor sea de 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.

1.2. Solución salina peptonada

Digesto enzimático de caseína	1.0 g
Cloruro de sodio	8.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua, si es necesario calentar. Ajustar el pH para que luego de la esterilización su valor sea de 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. Agar Baird Parker

2.1. Medio base

Digesto pancreático de caseína	10.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Extracto de carne	5.0 g
Piruvato de sodio	10.0 g
L – glicina	12.0 g
Cloruro de litio	5.0 g
Agar	12.0 a 20.0 g*
Agua destilada	1000 ml

* dependiendo de la firmeza del agar

Disolver los componentes en agua hasta ebullición. Ajustar el pH para que luego de la esterilización su valor sea de 7.0 ± 0.2 a 25°C.

Fraccionar en volúmenes de 100 ml en frascos o botellas de capacidad adecuada. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

2.2. Solución de telurito de potasio

Telurito de potasio (K ₂ TeO ₃)	1.0 g
Agua destilada	100 ml

Disolver completamente el telurito de potasio en agua destilada con mínimo calentamiento. Esterilizar por filtración utilizando membrana con poros de 0.22 µm de tamaño. Conservar a 3°C ± 2°C por un máximo de 3 meses. Descartar la solución si se forma un precipitado blanco

2.3 Emulsión yema de huevo

(Concentración aproximada 20 % o de acuerdo a las indicaciones del fabricante)

NOTA: En caso de haber disponible se debería utilizar una preparación comercial.

Preparación:

Utilizar huevos frescos con la cáscara intacta. Lavar los huevos con cepillo utilizando detergente líquido, enjuagar con agua y desinfectar sumergiéndolos en etanol (solución 70%) durante 30 segundos y dejar secar al aire o rociarlos con alcohol y esterilizar a la llama.

En condiciones asépticas romper cada huevo, separar la yema de la clara pasando la yema varias veces de una mitad de la cáscara a la otra.

Colocar las yemas en un frasco estéril y agregar 4 veces su volumen de agua estéril y mezclar perfectamente. Calentar la preparación en baño de agua a 47°C durante 2 horas y dejar de 18 h a 24 h a 3°C ± 2°C hasta que se forme un precipitado. Asépticamente recolectar el sobrenadante y conservar en un frasco estéril. La preparación se debe conservar a 3°C ± 2°C, durante un máximo de 72 h.

2.4 Solución de sulfamezatina (sulfametazina, sulfadimidina)

Nota: esta solución se utiliza sólo si se sospecha que la muestra está contaminada con *Proteus*

Sulfamezatina	0.2 g
Solución de Hidróxido de sodio (NaOH)=0.1 mol/l	10 ml
Agua destilada	90 ml

Disolver la sulfamezatina en la solución de Hidróxido de sodio y diluir con agua destilada hasta llegar a un volumen de 100 ml. Esterilizar

por filtración utilizando membrana con poros de 0.22 μm de tamaño. Conservar entre $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por un máximo de 1 mes.

2.5 Medio completo

Medio base (2.1)	100 ml
Solución Telurito de potasio (2.2)	1.0 ml
Emulsión yema de huevo (2.3)	5.0 ml
Solución de sulfamezatina (2.4) (si es necesario)	2.5 ml

Fundir el medio base, enfriar aproximadamente a 47°C y agregar en condiciones de asepsia la solución de telurito de potasio (2.2) y la emulsión yema de huevo (2.3) y la solución de sulfamezatina (2.4), si se considera necesario porque se sospecha de la presencia de *Proteus*. Cada solución debe ser previamente calentada a 47°C en baño de agua y mezclar bien después de cada adición.

2.6 Preparación de las placas

Colocar en las placas de Petri una cantidad adecuada del medio completo para obtener una capa de 4 mm de espesor y dejar solidificar.

Las placas pueden ser almacenadas antes del secado hasta 24 h a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Antes de utilizar secar las placas preferentemente sin tapa y con la superficie del agar hacia abajo en una estufa a una temperatura entre 25°C y 50°C , hasta que hayan desaparecido las gotas de agua de la superficie del medio.

3. Caldo cerebro corazón infusión (caldo BHI)

Digesto enzimático de tejido animal	10.0 g
Infusión de cerebro de ternero deshidratada	12.5 g
Infusión de carne corazón deshidratada	5.0 g
Glucosa	2.0 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
Disodio hidrógeno fosfato anhidro (Na_2HPO_4)	2.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada llevando a ebullición. Ajustar el pH para que luego de la esterilización su valor sea de 7.4 ± 0.2 a 25°C . Dispensar en porciones de 10 ml o 5 ml en tubos. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

4. Plasma de conejo

Utilizar plasma de conejo deshidratado disponible en el comercio y rehidratar siguiendo las indicaciones del fabricante.

Si el plasma de conejo no está disponible en el comercio diluir un volumen de plasma de conejo fresco estéril con tres volúmenes de agua destilada estéril.

Si se ha utilizado citrato de sodio o citrato de potasio como anticoagulante, agregar solución de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) para llegar a una concentración de EDTA del 0.1 % en el plasma diluido.

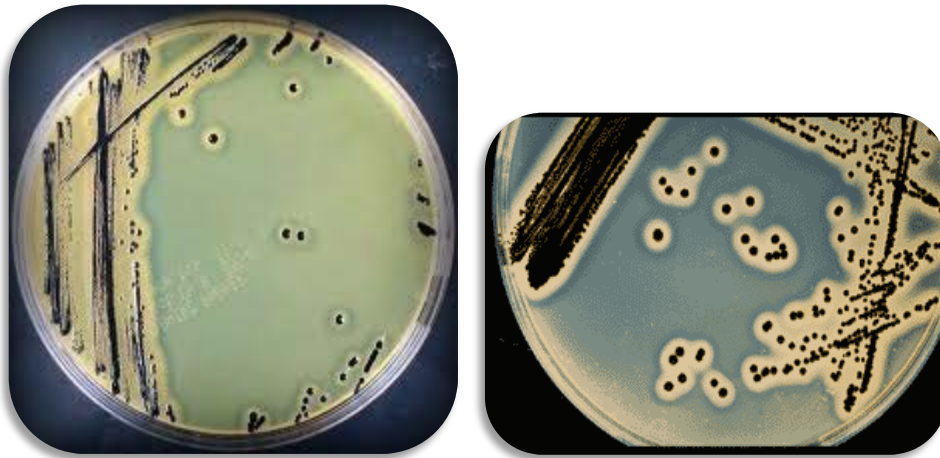
NOTA: el plasma con oxalato o heparina no requiere del agregado de EDTA.

El plasma rehidratado o diluido debe ser utilizado inmediatamente al menos que el fabricante de otras especificaciones.

Antes de utilizar cada lote de plasma realizar un control con una cepa de estafilococo coagulasa positiva y una cepa de estafilococo coagulasa negativa.

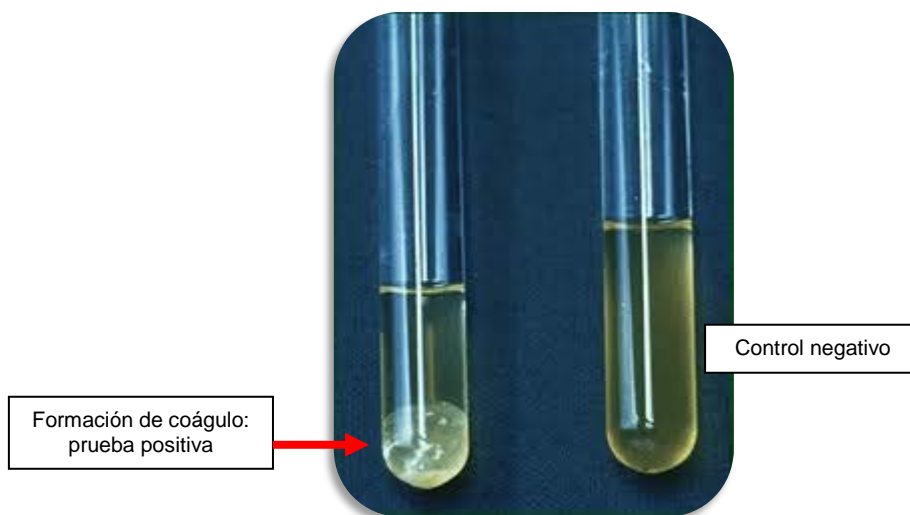
ANEXO 3: FOTOS

1. Agar Baird Parker



Staphylococcus aureus: colonias típicas negras o grises con brillo, convexas, rodeadas por una zona de clarificación que puede ser parcialmente opaca. Después de una incubación de por lo menos 24 h puede aparecer un anillo opalescente de precipitación inmediatamente alrededor de la colonia.

1. Prueba de la coagulasa



Staphylococcus aureus: Prueba de la coagulasa

5. REFERENCIAS

(1) International Standard. ISO 6888 – 1. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of coagulase - positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). Part 1: Technique using Baird Parker agar medium. First edition 1999-02-15

(2) International Standard. ISO 6887 – 1. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. First edition, 1999-02-15.

(3) International Standard. ISO 7218: 2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs. General requirements and guidance for microbiological examinations. Third edition, 2007-08-15.

NOTA: Las siguientes normas de referencias son indispensables para la aplicación del presente procedimiento. Para cada norma de referencia debe aplicarse la edición citada, en caso de no especificarse la misma, deberá aplicarse la última edición (incluyendo cualquier modificación).

ISO 6887-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

ISO 6887-2, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products

ISO 6887-3, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products

ISO 6887-4, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products meat and meat products, and fish and fishery products

ISO 7218, Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations.

ISO 6887-5, Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products

ISO/TS 11 33-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 1 : General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory

ISO/TS 11 133-2:2003, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media

NOTAS PERSONALES



A series of 15 horizontal dashed lines spanning the width of the page, providing a template for writing.

Recuento de Estafilococos coagulasa positiva en muestras de alimentos

Técnica de recuento en placa

Procedimiento según
International Commission on Microbiological Specifications for Foods
(ICMSF), Método 1

Nota: Este procedimiento es equivalente al procedimiento según la ISO 6888-1

Con las siguientes salvedades:

- 1.** En el punto 3.5.2.2. Inoculación e incubación: No especifica que para un número bajo de estafilococos coagulasa positiva el límite de detección puede ser elevado por un factor de 10 sembrando 1 ml de la muestra si el producto es líquido ó 1 ml de la suspensión inicial (dilución 1/10) en caso de otros productos y 1 ml de las diluciones sucesivas como lo especifica en el procedimiento según la ISO 6888-1
- 2.** En el punto 3.5.3.2. Recuento y selección de las colonias: Pasadas 30 horas de incubación elegir las placas que contengan entre 20 y 200 colonias aisladas para realizar el recuento

Estafilococos coagulasa positiva.

Detección y enumeración por la técnica de número más probable (NMP) en muestras de alimentos

Procedimiento según
International Standard Organization ISO 6888-3: 2003 (corrección 2004)

1. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar la enumeración y la confirmación de estafilococos coagulasa positiva (*Staphylococcus aureus* y otras especies), por la técnica de número más probable (NMP), en muestras de alimentos y en muestras ambientales de las áreas de producción y manipulación de alimentos.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica para realizar la enumeración y la confirmación de estafilococos coagulasa positiva (*Staphylococcus aureus* y otras especies) por técnica de NMP en muestras de alimentos y muestras ambientales en el área de producción y manipulación de alimentos.

Este método es recomendado para productos donde los estafilococos pueden estar estresados y en bajo número, por ejemplo en productos secos.

Los estafilococos coagulasa positiva son en mayor medida *Staphylococcus aureus*, pero *Staphylococcus intermedius* y algunas especies de *Staphylococcus hyicus* pueden producir coagulasa

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.

Normas de referencia: Para la aplicación del presente procedimiento son indispensables las normas citadas en el punto 5. Referencias

3. DESARROLLO

3.1. Definiciones y abreviaturas

Para el propósito de este documento

- Estafilococo coagulasa positiva: bacteria que forma colonias típicas o atípicas en la superficie de un medio de cultivo selectivo y que da una reacción positiva para la prueba de la coagulasa o una reacción específica del plasma de conejo en el agar fibrinógeno plasma de conejo.

NOTA: En este procedimiento la confirmación de los estafilococos coagulasa positiva está basada en una reacción fuertemente positiva de la prueba de la coagulasa, pero es sabido que algunas cepas de estafilococos coagulasa positiva dan una reacción débil pudiendo ser confundidas con otras bacterias. En este caso, las cepas que dan una reacción débil de coagulasa pueden distinguirse utilizando otras pruebas adicionales como la producción de termonucleasa.

- Enumeración de estafilococo coagulasa positiva: determinación del número de estafilococos coagulasa positiva por mililitro o gramo de muestra.

3.2. Principio (ver Anexo 1)

3.2.1. Método de detección

El método está basado en las siguientes etapas:

3.2.1.1. Inoculación de un medio de cultivo selectivo con una cantidad específica de la muestra si el producto es líquido o con una cantidad específica de la dilución inicial en caso de otros productos.

3.2.1.2. Incubación de los tubos inoculados a 37°C en anaerobiosis durante 24 h y 48 h. La presencia de presuntivos estafilococos coagulada positiva es indicada por la reducción del telurito de potasio.

NOTA: En este procedimiento se logra la anaerobiosis mediante la formación de un tapón de agar o parafina en cada tubo o por la incubación de los tubos en una estufa o jarra en condiciones de anaerobiosis.

3.2.1.3. Inoculación por superficie del medio de cultivo agar Baird Parker a partir de los tubos presuntamente positivos incubados durante 24 h y el resto de los tubos de 48 h.

3.2.1.4 Incubación de las placas a 37°C durante 24 h y 48 h. La presencia de estafilococos coagulasa positiva presuntivos es indicada por la reducción del telurito de potasio y la reacción de la yema de huevo.

3.2.1.5. Confirmación de las colonias típicas y atípicas por la prueba de la coagulasa

NOTA: Alternativamente se puede inocular la superficie de un medio agar fibrinógeno plasma de conejo y luego de una incubación

apropiada, determinar la presencia de estafilococos coagulasa positiva, indicada por las colonias que dan una reacción específica con el fibrinógeno del plasma de conejo.

3.2.1.6. Expresión de resultados como “presencia” o “ausencia” de estafilococos coagulasa positivos en x g ó x ml de producto.

3.2.2. Método de enumeración

El método está basado en las siguientes etapas:

3.2.2.1. Inoculación de un medio de cultivo líquido selectivo con diluciones decimales sucesivas del producto.

3.2.2.2. Incubación de los tubos inoculados a 37°C en anaerobiosis durante 24 h y 48 h. La presencia de estafilococos coagulasa positiva presuntivos es indicada por la reducción del telurito de potasio.

NOTA: En este procedimiento se logra la anaerobiosis mediante la formación de un tapón de agar o parafina en cada tubo o por la incubación de los tubos en una estufa o jarra en condiciones de anaerobiosis.

3.2.2.3. Inoculación por superficie del medio de cultivo agar Baird Parker a partir de los tubos positivos presuntivos incubados durante 24 h y el resto de los tubos de 48 h.

3.2.2.4 Incubación de las placas a 37°C durante 24 h y 48 h. La presencia de estafilococos coagulasa positiva presuntivos es indicada por la reducción del telurito de potasio y la reacción de la yema de huevo.

3.2.2.5. Confirmación de las colonias típicas y atípicas por la prueba de la coagulasa

NOTA: Alternativamente se puede inocular la superficie de un medio agar fibrinógeno plasma de conejo y luego de una incubación apropiada, determinar la presencia de estafilococos coagulasa positiva, indicada por las colonias que dan una reacción específica con el fibrinógeno del plasma de conejo.

3.2.2.6. El número más probable (NMP) de estafilococos coagulasa positivos por mililitro o por gramo de muestra es calculado teniendo en cuenta las diluciones confirmadas y utilizando la tabla de NMP.

3.3. Medios de cultivo, soluciones, reactivos para propiedades bioquímicas y equipos (ver ANEXO 2)

3.3.1. Agua peptona bufferada (BPW)

3.3.2. Solución salina peptonada (SFP)

3.3.3. Caldo Giolitti y Cantoni modificado

3.3.4. Solución agar

3.3.5. Agar Baird Parker

- 3.3.6. Agar fibrinógeno plasma de conejo
- 3.3.7. Solución de telurito de potasio al 1 %
- 3.3.8. Solución de yema de huevo (aproximadamente al 20% o de acuerdo a las instrucciones del fabricante)
- 3.3.9. Caldo cerebro, corazón, infusión (caldo BHI)
- 3.3.10. Plasma de conejo
- 3.3.11. Estufa de esterilización
- 3.3.12. Autoclave
- 3.3.13. Estufa de incubación: $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 3.3.14. Baño de agua o aparato similar capaz de mantener la temperatura a 44°C , 47°C y 37°C .
- 3.3.15. Peachímetro de exactitud 0.01 a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- 3.3.16. Pipetas de 1 ml de capacidad graduadas en intervalos de 0.1 ml.
- 3.3.17. Anclas de platino-iridio o níquel-cromo de aprox. 3 mm de diámetro y anclas de punción del mismo material, o equivalentes estériles descartables.
- 3.3.18. Tubos de ensayo, botellas o frascos de capacidad apropiada, en particular de 16 mm x 160 mm y tubos de hemólisis.
- 3.3.19. Placas de Petri de vidrio o plástico de 90 a 100 mm de diámetro.
- 3.3.20. Espátula para cortar el agar
- 3.3.21. Jarra de anaerobiosis

3.4. Muestreo

El plan de muestreo a utilizar está fuera del alcance de esta metodología.

3.5. Procedimiento

3.5.1. Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones (ISO 6887-1:1999)

NOTA: Para este punto referir a la norma ISO 6887 – 1 y las normas específicas para el alimento en cuestión. (Ver punto 5. Referencias)

3.5.1.1. Suspensión inicial

En un frasco estéril o bolsa de plástico estéril pesar con una incertidumbre de medición de $\pm 5\%$ una cantidad de masa x g o medir con una incertidumbre de medición de $\pm 5\%$ un volumen x ml (como mínimo 10 g ó 10 ml a menos que se indique otra cantidad). Agregar una cantidad del diluyente igual a $9x$ g ó $9x$ ml (dilución 1/10) y homogeneizar entre 1 minuto a 3 minutos dependiendo del alimento.

Para evitar daños de los microorganismos por cambios bruscos de temperatura, procurar que la temperatura del diluyente y la ambiental sean similares.

NOTA: En algunos casos, particularmente para los productos muy viscosos o muy espesos, podría ser necesario agregar mayor cantidad de diluyente lo cual debe tenerse en cuenta en las operaciones subsiguientes y / o en la expresión de resultados.

3.5.1.2. Diluciones decimales

Transferir con una pipeta 1ml (con una incertidumbre de medición de $\pm 5 \%$) de la suspensión inicial en un tubo con 9 ml del diluyente estéril.

Para una óptima precisión no introducir la pipeta más de 1 cm en la suspensión inicial y evitar el contacto entre la pipeta que contiene el inóculo y el diluyente estéril.

Mezclar utilizando preferentemente un agitador mecánico durante 5 segundos a 10 segundos para obtener la dilución 10^{-2} .

Si es necesario repetir esta operación a partir de la dilución 10^{-2} y diluciones sucesivas, utilizando en cada operación una nueva pipeta estéril para obtener las siguientes diluciones (10^{-3} , 10^{-4} , etc.). Se realizan las diluciones que sean necesarias para obtener un número apropiado de microorganismos para realizar el recuento. (Ver 3.5.3.)

3.5.1.3. Duración del procedimiento

El tiempo transcurrido entre el final de la preparación de la suspensión inicial y el instante en que el inóculo entra en contacto con el medio de cultivo no debe superar los 45 minutos, mientras que el lapso de tiempo límite entre la preparación de la suspensión inicial y el comienzo de la preparación de las diluciones decimales sucesivas es de 30 minutos.

NOTA: si la temperatura ambiente del laboratorio es muy alta estos dos lapsos de tiempo deben ser reducidos.

3.5.2. Inoculación e incubación

3.5.2.1. Método de detección

3.5.2.1.1. Porción de muestra para el ensayo y suspensión inicial

Agregar 1 ml de la suspensión inicial a un tubo con 9 ml del caldo Giolitti y Cantoni modificado simple concentración (es decir 0.1 g ó 0.1 ml de la muestra) ó 10 ml de la suspensión inicial a un tubo con 10 ml del caldo Giolitti y Cantoni modificado doble concentración (es decir 1 g ó 1 ml de la muestra). Para cantidades más grandes de muestra de ensayo, preparar la suspensión inicial agregando x ml o x g de la muestra a 9 x ml del diluyente (ver 3.5.1.1.). Luego agregar toda la suspensión inicial a 90 x ml del caldo Giolitti y Cantoni modificado simple concentración previamente desaereado y con telurito de potasio agregado, de este modo quedará un mínimo de volumen de aire en el tubo o frasco (ejemplo agregar 5 ml ó 5 g de la muestra a 45 ml del diluyente y agregar todo el volumen de

suspensión inicial a 450 ml del caldo Giolitti y Cantoni modificado simple concentración. Cuidadosamente formar un tapón de agar o parafina, enfriar entre 44°C y 47°C en la parte superior del medio y dejar solidificar para sellar el tubo.

3.5.2.1.2. Enriquecimiento

Incubar la suspensión inicial durante 24 h \pm 2 h a 37°C. Si se observa formación de un precipitado negro sembrar como se indica en 3.5.2.1.3, si no se observa formación de un precipitado negro incubar durante 24 h más y sembrar como se indica en 3.5.2.1.3. (haya o no formación de precipitado negro)

3.5.2.1.3. Siembra de los tubos

Retirar asépticamente el tapón de agar o parafina utilizando una espátula estéril para cortar el agar en cuartos a lo largo. Si es necesario introduzca la espátula alrededor del tapón para liberarlo de las paredes del tubo. Agitar el tubo para que los pedacitos de tapón se depositen en el fondo del tubo y para resuspender el cultivo.

Con un ansa estéril estriar cada uno de los caldos seleccionados en la superficie de placas de agar Baird Parker o placas de agar fibrinógeno plasma de conejo para obtener colonias aisladas.

3.5.2.1.4. Incubación

Invertir las placas sembradas e incubar a 37°C durante 24 h \pm 2 h y 48 h \pm 2 h.

3.5.2.2. Método de enumeración

3.5.2.2.1. Porción de muestra para el ensayo y suspensión inicial

Preparar la suspensión inicial y las diluciones decimales de acuerdo al ítem 3.5.1.

3.5.2.2.2. Inoculación

Tomar 3 tubos con medio doble concentración desaereado y con telurito de potasio agregado. Transferir a cada uno de los tubos 10 ml de la muestra inicial para productos líquidos ó 10 ml de la suspensión inicial (es decir 1 g de la muestra) para otros productos.

Tomar 3 tubos con medio simple concentración desaereado y con telurito de potasio agregado. Transferir a cada uno de los tubos 1 ml de la muestra inicial para productos líquidos ó 1 ml de la suspensión inicial (es decir 0.1 g de la muestra) para otros productos.

Para cada dilución decimal sucesiva (ej. 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} para productos líquidos, ó 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} para otros productos) transferir 1 ml a 3 tubos con medio simple concentración desaereado y con telurito de potasio agregado.

Preparar un número adecuado de diluciones para asegurar que la dilución final es suficiente para obtener tres tubos negativos.

En cada caso mezclar cuidadosamente los tubos evitando la introducción de aire.

Cuidadosamente formar un tapón de agar o parafina, enfriar entre 44°C y 47°C en la parte superior del medio y dejar solidificar para sellar el tubo.

3.5.2.2.3. Incubación

Incubar los tubos inoculados (3.5.2.2.2) durante 24 h \pm 2 h a 37°C. Si se observa formación de un precipitado negro sembrar como se indica en 3.5.2.2.4, si no se observa formación de un precipitado negro incubar durante 24 h más y sembrar como se indica en 3.5.2.2.3.4 (haya o no formación de precipitado negro)

3.5.2.2.4. Siembra de los tubos

Ver 3.5.2.1.3.

3.5.2.2.5. Incubación de las placas

Invertir las placas sembradas e incubar a 37°C durante 24 h \pm 2 h y 48 h \pm 2 h.

3.5.3 Selección e interpretación de las placas

3.5.3.1. Agar Baird Parker

3.5.3.1.1. Selección de colonias

Después de la incubación de 24 h \pm 2 h marcar en el fondo de la placa la posición de cualquier colonia típica presente. (Ver NOTA 1) Incubar todas las placas a 37°C durante 24 h \pm 2 h adicionales y marcar todas las colonias típicas nuevas. También marcar las colonias atípicas presentes. (Ver NOTA 2).

NOTA 1: Las colonias típicas son negras o grises con brillo y convexas (de 1 mm a 1.5 mm de diámetro después de una incubación de 24 h y de 1.5 mm a 2.5 mm de diámetro después de una incubación de 48 h) y rodeadas por una zona de clarificación que puede ser parcialmente opaca. Después de una incubación de por lo menos 24 h puede aparecer un anillo opalescente de precipitación inmediatamente alrededor de la colonia.

NOTA 2: Las colonias atípicas son del mismo tamaño que las típicas y pueden presentar una de las siguientes morfologías:

- Colonias negras con brillo, con o sin un fino borde blanco, la zona de clarificación está ausente o es vagamente visible y el anillo opalescente ausente o poco visible.
- Colonias grises sin zona de clarificación.

Las colonias atípicas son formadas principalmente por cepas de estafilococos coagulasa positiva presentes por ejemplo en productos lácteos, camarones y menudillos. Con menos frecuencia son formadas

por cepas de estafilococos coagulasa positiva presentes en otros productos.

NOTA 3: Las colonias restantes que pueden estar presentes en la placa y que no presentan apariencia de colonias típicas (NOTA 1) o atípicas (NOTA 2) son consideradas como flora acompañante.

3.5.3.1.2. Confirmación: prueba de la coagulasa

De la superficie de cada colonia seleccionada remover un inóculo con ansa aguja y transferir a un tubo con caldo cerebro, corazón infusión (caldo BHI), incubar a 37°C durante 24 h ± 2 h.

Asépticamente agregar 0.1 ml de cada cultivo en 0.3 ml de plasma de conejo (al menos que otra cantidad sea especificada por el fabricante) en un tubo de hemólisis estéril. Incubar a 37°C ± 1°C.

Inclinando el tubo observar la formación de coágulo después de 4 h a 6 h de incubación. Si la prueba es negativa reexaminar después de 24 h de incubación

Considerar un resultado positivo si el cultivo produce al menos una reacción +3 de acuerdo al puntaje de la figura 1, las reacciones de +1 a +2 son consideradas como intermedias.

Como control negativo para cada lote de plasma agregar 0.1 ml de caldo BHI estéril a 0.3 ml de plasma de conejo e incubar sin inoculación. Para que la prueba sea válida el control negativo no debe mostrar signos de coagulación.

Registrar como positivo cada tubo desde el cual al menos una colonia es confirmada con la prueba de coagulasa positiva.

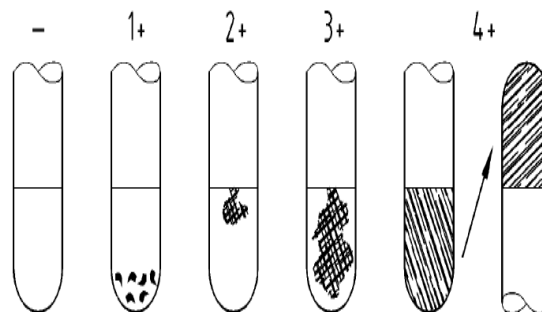


Figura 1: Puntaje de la prueba de la coagulasa

Negativo (-): no hay evidencia de formación de coágulo

Positivo +1: coágulos pequeños y desorganizados

Positivo +2: un coágulo pequeño organizado

Positivo +3: un coágulo grande organizado

Positivo +4: La totalidad del contenido coagula y el coágulo no se desliza cuando el tubo es invertido.

3.5.4. Expresión de resultados

3.5.4.1. Método de detección

De acuerdo a la interpretación de los resultados informar presencia o ausencia de Estafilococos coagulasa positiva en la cantidad de muestra analizada por gramos o mililitros para muestras líquidas.

3.5.4.2. Método de enumeración (ISO 7218)

3.5.4.2.1. Selección de las diluciones

Nota: La suspensión inicial y la muestra para el caso de productos líquidos son consideradas como diluciones.

Para cada dilución inoculada en el medio líquido, registrar el número de tubos positivos en los cuales se confirmó la presencia de Estafilococos coagulasa positiva.

3.5.4.2.2. Selección de resultados positivos para el cálculo de NMP

Hay combinaciones de tubos positivos con una probabilidad de aparición mucho mayor que otras. Por ejemplo, es mucho menos probable que aparezca una combinación de resultados positivos de 0, 0, 3 que una combinación de 3, 2, 1. Para cuantificar esta probabilidad, se ha asignado un índice de 0 a 3 a todas las combinaciones posibles de resultados positivos. La categoría 1 corresponde a los resultados de probabilidad más alta, mientras que los resultados de la categoría 3 son raros y no son fáciles de reproducir. Los peores casos son los resultados de la categoría 0, deberían considerarse con un alto grado de desconfianza. Asumiendo que los resultados del análisis son correctos, debería esperarse que el 95% de las combinaciones correspondan a la categoría 1, el 4 % a la categoría 2 y el 0.9% a la categoría 3 y solamente el 0.1% a la categoría 0. En la tabla 2 del Anexo 3 se explican con más detalles las categorías.

En el caso que se realicen más de tres diluciones, la selección de la combinación "correcta" de tres diluciones consecutivas no siempre es muy evidente. Sin embargo, se puede hacer fácilmente registrando todas las combinaciones posibles de tubos positivos, determinando en la tabla 1 a cual categoría corresponde.

Por consiguiente, se aplican las reglas siguientes:

- Se selecciona la combinación de tres diluciones consecutivas con un perfil de categoría 1 para obtener el índice de NMP. Si se obtiene más de una combinación con perfil de categoría 1, se utiliza la que tenga un mayor número de tubos positivos.
- Si no se encuentra ninguna combinación de categoría 1, se utiliza la que presente un perfil de categoría 2. Si se obtiene

más de una categoría con perfil de categoría 2, se utiliza la que tenga un mayor número de tubos positivos.

- Si no se encuentra ninguna combinación de categoría 2, se utiliza la que presente un perfil de categoría 3. Si se obtiene más de una categoría con perfil de categoría 3, se utiliza la que tenga un mayor número de tubos positivos.

En la tabla siguiente se muestran algunos ejemplos

Ejemplo de selección de resultados positivos para el cálculo de NMP

Muestra	Número de tubos positivos obtenidos a partir de tres tubos incubados para las siguientes cantidades de muestra inoculada por tubo ^a						NMP ^b	
							Producto líquido (ml ⁻¹)	Resto de productos (g ⁻¹)
	Producto líquido	10 ml	1 ml	10 ⁻¹ ml	10 ⁻² ml	10 ⁻³ ml		
	Resto de productos	1 g	10 ⁻¹ g	10 ⁻² g	10 ⁻³ g	10 ⁻⁴ g		
1		<u>3</u>	<u>3</u>	<u>2</u>	1	0	1,1 × 10 ¹	1,1 × 10 ²
2		3	<u>3</u>	<u>3</u>	<u>0</u>		2,4 × 10 ¹	2,4 × 10 ²
3		2	2	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	7,4	7,4 × 10 ¹
4		<u>3</u>	<u>3</u>	<u>0</u>	0	0	2,4	2,4 × 10 ¹
5		<u>2</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	1	0	2,1 × 10 ⁻¹	2,1

^a El subrayado indica la combinación escogida.

^b Calculado mediante el uso del índice de NMP (véase la tabla B.5).

|: ISO 7218

3.5.4.2.3. Cálculo y expresión de resultados

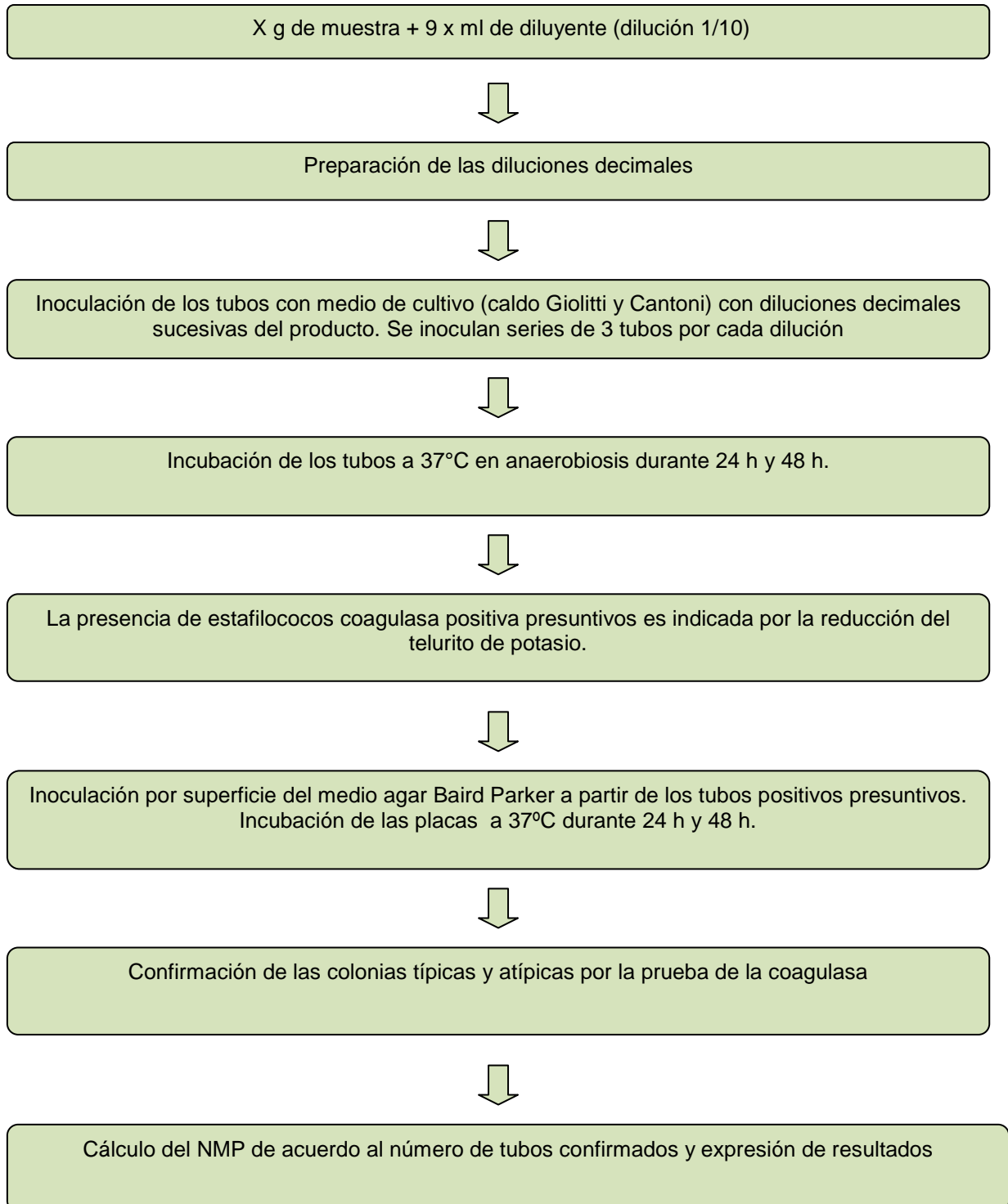
Seleccionar tres diluciones consecutivas de acuerdo al punto 3.5.5.2.2. y determinar el NMP entrando en la tabla 1 del ANEXO 3.

Utilizando el índice de NMP determinado en la tabla 1, se determina la cantidad más probable de microorganismos en el volumen de referencia.

El resultado se expresa cómo el número más probable de Estafilococos coagulasa positiva por gramo o mililitro.

4. ANEXOS

ANEXO 1: Diagrama de flujo del procedimiento para recuento de estafilococos coagulasa positiva



ANEXO 2: Medios de cultivos y reactivos

1. Diluyentes

1.1. Agua Peptona Bufferada (BPW)

Digesto enzimático de tejidos animales	10.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Fosfato disódico mono ácido dodecahidratado (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	9.0 g
Fosfato monopotásico diácido (KH ₂ PO ₄)	1.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua, si es necesario calentar. Ajustar el pH para que luego de la esterilización su valor sea de 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.

1.2. Solución salina peptonada (SFP)

Digesto enzimático de caseína	1.0 g
Cloruro de sodio	8.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua, si es necesario calentar. Ajustar el pH para que luego de la esterilización su valor sea de 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 Giolitti y Cantoni modificado

2.1. Medio base

	Doble concentración	Simple concentración
Digesto enzimático de caseína	20.0 g	10.0 g
Extracto de carne	10.0 g	5.0 g
Extracto de levadura	10.0 g	5.0 g
Cloruro de litio	10.0 g	5.0 g
Manitol	40.0 g	20.0 g
Cloruro de sodio	10.0 g	5.0 g
Glicina	2.4 g	1.2 g
Piruvato de sodio	6.0 g	3.0 g
Polyoxyethylenesorbitan monooleato (Tween 80)	2.0 g	1.0 g

Agua destilada	1000 ml	1000 ml
----------------	---------	---------

Disolver los componentes en agua, calentando y mezclando si es necesario. Enfriar a temperatura ambiente y ajustar el pH para que después de la esterilización sea de 6.9 ± 0.2 a 25°C . Fraccionar en cantidades apropiadas en tubos de dimensiones adecuadas (ej. 16 mm x 160 mm en el caso del medio simple concentración y 20 mm x 200 mm en el caso del medio doble concentración). Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

2.2. Solución de telurito de potasio

Telurito de potasio (K_2TeO_3)	1.0 g
Agua destilada	100 ml

Disolver completamente el telurito de potasio en agua destilada con mínimo calentamiento. Esterilizar por filtración utilizando membrana con poros de $0.22 \mu\text{m}$ de tamaño. Conservar a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por un máximo de 1 mes. Descartar la solución si se forma un precipitado blanco.

2.3 Medio completo

Antes de usar calentar el medio base (2.1) a 100°C durante 15 minutos para eliminar el aire. Enfriar entre 44°C y 47°C y asépticamente agregar la solución de telurito de potasio (2.2): 0.1 ml para los tubos con medio simple concentración y 0.2 ml para los tubos con medio doble concentración.

3. Solución de agar (20 g/l)

Agar	15 a 20 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver el agar en agua hasta ebullición y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar entre 44°C y 47°C antes de su uso.

4. Agar Baird Parker

4.1. Medio base

Digesto pancreático de caseína	10.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Extracto de carne	5.0 g
Piruvato de sodio	10.0 g
L –glicina	12.0 g

Cloruro de litio	5.0 g
Agar	12.0 a 20.0 g*
Agua destilada	1000 ml

* dependiendo de la firmeza del agar

Disolver los componentes en agua hasta ebullición. Ajustar el pH para que después de la esterilización sea de 7.2 ± 0.2 a 25°C . Fraccionar en volúmenes de 100 ml en frascos o botellas de capacidad adecuada. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

4.2. Solución de telurito de potasio

Telurito de potasio (K_2TeO_3)	1.0 g
Agua destilada	100 ml

Disolver completamente el telurito de potasio en agua destilada con mínimo calentamiento. Esterilizar por filtración utilizando membrana con poros de $0.22 \mu\text{m}$ de tamaño. Conservar a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por un máximo de 3 meses.

4.3 Emulsión yema de huevo (de concentración aproximada 20 % o de acuerdo a las instrucciones del fabricante). En caso de haber disponible se debería utilizar una preparación comercial.

Preparación:

Utilizar huevos frescos con la cáscara intacta. Lavar los huevos con cepillo utilizando detergente líquido, enjuagar con agua y desinfectar sumergiéndolos en etanol (solución 70%) durante 30 segundos y dejar secar al aire o rociarlos con alcohol y esterilizar a la llama.

En condiciones asépticas romper cada huevo, separar la yema de la clara pasando la yema varias veces de una mitad de la cáscara a la otra.

Colocar las yemas en un frasco estéril y agregar 4 veces su volumen de agua estéril y mezclar perfectamente. Calentar la preparación en baño de agua a 47°C por 2 horas y dejar de 18 a 24 h a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta que se forme un precipitado. Asépticamente recolectar el sobrenadante y conservar en un frasco estéril. La preparación se debe conservar a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante un máximo de 72 h.

4.4 Solución de sulfamezatina (sulfametazina, sulfadimidina)

Nota: esta solución se utiliza sólo si se sospecha que la muestra está contaminada con *Proteus*

Sulfamezatina	0.2 g
Solución de hidróxido de sodio (NaOH) = 0.1 mol/l	10 ml
Agua destilada	90 ml

Disolver la sulfamezatina en la solución de hidróxido de sodio y diluir con agua destilada hasta llegar a un volumen de 100 ml. Esterilizar por filtración utilizando membrana con poros de 0.22 μm de tamaño. Conservar a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por un máximo de 1 mes.

4.5 Medio completo

Medio base (2.1)	100 ml
Solución Telurito de potasio (2.2)	1.0 ml
Emulsión yema de huevo (2.3)	5.0 ml
Solución de sulfamezatina (2.4) (si es necesario)	2.5 ml

Fundir el medio base, enfriar aproximadamente a 47°C y agregar en condiciones de asepsia la solución de telurito de potasio (2.2) y la emulsión yema de huevo (2.3) y la solución de sulfamezatina (2.4), si se considera necesario porque se sospecha de la presencia de *Proteus*. Cada solución debe ser previamente calentada a 47°C en baño de agua y mezclar bien después de cada adición.

4.6 Preparación de las placas

Colocar en las placas de Petri una cantidad adecuada del medio completo para obtener una capa de 4 mm de espesor y dejar solidificar.

Las placas pueden ser almacenadas antes del secado hasta 24 h a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Antes de utilizar secar las placas preferentemente sin tapa y con la superficie del agar hacia abajo en una estufa a una temperatura entre 25°C y 50°C , hasta que hayan desaparecido las gotas de agua de la superficie del medio.

5. Agar fibrinógeno plasma de conejo

NOTA: Se pueden utilizar los medios comercialmente disponibles que estén de acuerdo con las especificaciones de este punto de la norma. Sin embargo, teniendo en cuenta la variabilidad experimentada de los lotes manufacturados del suplemento, se recomienda que cada lote de solución de fibrinógeno bovino / plasma de conejo sea testeada antes de su uso, mediante la ejecución de controles positivos y negativos.

5.1. Medio base

Digesto pancreático de caseína	10.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Extracto de carne	5.0 g
Piruvato de sodio	10.0 g

L –glicina	12.0 g
Cloruro de litio	5.0 g
Agar	12.0 a 20.0 g*
Agua destilada	1000 ml

* dependiendo de la firmeza del agar

Disolver los componentes en agua hasta ebullición. Ajustar el pH para que después de la esterilización sea de 7.2 ± 0.2 a 25°C . Fraccionar en volúmenes de 90 ml en frascos o botellas de capacidad adecuada. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

5.2. Solución de telurito de potasio

Telurito de potasio (K_2TeO_3)	1.0 g
Agua destilada	100 ml

Disolver completamente el telurito de potasio en agua destilada con mínimo calentamiento. Esterilizar por filtración utilizando membrana con poros de $0.22 \mu\text{m}$ de tamaño. Conservar a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por un máximo de 3 meses.

5.3. Solución de fibrinógeno bovino

Fibrinógeno bovino	5.0 g a 7 g*
Agua destilada	100 ml

* Dependiendo de la pureza del fibrinógeno bovino

En condiciones asépticas disolver el fibrinógeno en agua antes de utilizar.

5.4. Plasma de conejo y solución de inhibidor de tripsina

Plasma de conejo con EDTA para coagulasa	30 ml
Inhibidor de tripsina	30 g

En condiciones asépticas disolver los componentes en agua antes de utilizar.

5.5. Medio completo

Medio base (5.1)	90 ml
Solución Telurito de potasio (5.2)	0.25 ml
Solución de fibrinógeno bovino (5.3)	7.5 ml
Plasma de conejo y solución de inhibidor de tripsina (5.4)	2.5 ml

Fundir el medio base, enfriar a $48^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en baño de agua y agregar en condiciones de asepsia las 3 soluciones previamente calentadas a $48^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en baño de agua.

Mezclar bien, por rotación, después de cada adición para reducir al mínimo la formación de espuma.

Utilice el medio completo inmediatamente después de su preparación, con el fin de evitar cualquier precipitación del plasma.

ADVERTENCIA Si se usa una solución de fibrinógeno bovino / plasma de conejo disponible en el mercado siga con sumo cuidado las instrucciones del fabricante para la preparación de esta solución y del medio completo (en particular, la temperatura del medio de base). De lo contrario, el medio puede perder por completo su actividad.

5.6 Preparación de las placas

Colocar en las placas de Petri una cantidad adecuada del medio completo para obtener una capa de 4 mm de espesor y dejar solidificar.

Las placas pueden ser almacenadas antes del secado hasta 24 h a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Antes de utilizar secar las placas preferentemente sin tapa y con la superficie del agar hacia abajo en una estufa a una temperatura entre 25°C y 50°C , hasta que hayan desaparecido las gotas de agua de la superficie del medio.

6. Caldo cerebro, corazón, infusión (caldo BHI)

Digesto enzimático de tejido animal	10.0 g
Infusión de cerebro de ternero deshidratada	12.5 g
Infusión de carne corazón deshidratada	5.0 g
Glucosa	2.0 g
Cloruro de sodio	0.5 g
Disodio hidrógeno fosfato anhidro (Na_2HPO_4)	2.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada llevando a ebullición. Ajustar el pH para que después de la esterilización sea de 7.4 ± 0.2 a 25°C . Dispensar en porciones de 10 ml o 5 ml en tubos. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

7. Plasma de conejo

Utilizar plasma de conejo deshidratado disponible en el comercio y rehidratar siguiendo las indicaciones del fabricante.

Si el plasma de conejo no está disponible en el comercio diluir un volumen de plasma de conejo fresco estéril con tres volúmenes de agua destilada estéril.

Si se ha utilizado citrato de sodio o citrato de potasio como anticoagulante, agregar solución de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) para llegar a una concentración de EDTA del 0.1 % en el plasma diluido.

NOTA: el plasma con oxalato o heparina no requiere del agregado de EDTA.

El plasma rehidratado o diluido debe ser utilizado inmediatamente al menos que el fabricante de otras especificaciones.

Antes de utilizar cada lote de plasma realizar un control con una cepa de estafilococo coagulasa positiva y una cepa de estafilococo coagulasa negativa.

ANEXO 3:

Tabla1: Índices de NMP y límites de intervalo de confianza (95%) cuando se utilizan tres porciones analíticas de 1g (ml), tres de 0.1g (ml) y tres de 0.01 g (ml)

Número de resultados positivos			Índice de NMP ^a	Categorías ^b	Límites del intervalo de confianza (95%) ^{a, c}	
					Límite inferior	Límite superior
0	0	0	<0,30		0,00	0,94
0	0	1	0,30	3	0,01	0,95
0	1	0	0,30	2	0,01	1
0	1	1	0,61	0	0,12	1,7
0	2	0	0,62	3	0,12	1,7
0	3	0	0,94	0	0,35	3,5
1	0	0	0,36	1	0,02	1,7
1	0	1	0,72	2	0,12	1,7
1	0	2	1,1	0	0,4	3,5
1	1	0	0,74	1	0,13	2
1	1	1	1,1	3	0,4	3,5
1	2	0	1,1	2	0,4	3,5
1	2	1	1,5	3	0,5	3,8
1	3	0	1,6	3	0,5	3,8
2	0	0	0,92	1	0,15	3,5
2	0	1	1,4	2	0,4	3,5
2	0	2	2,0	0	0,5	3,8
2	1	0	1,5	1	0,4	3,8
2	1	1	2,0	2	0,5	3,8
2	1	2	2,7	0	0,9	9,4
2	2	0	2,1	1	0,5	4
2	2	1	2,8	3	0,9	9,4
2	2	2	3,5	0	0,9	9,4
2	3	0	2,9	3	0,9	9,4
2	3	1	3,6	0	0,9	9,4
3	0	0	2,3	1	0,5	9,4
3	0	1	3,8	1	0,9	10,4
3	0	2	6,4	3	1,6	18,1
3	1	0	4,3	1	0,9	18,1
3	1	1	7,5	1	1,7	19,9
3	1	2	12	3	3	36
3	1	3	16	0	3	38
3	2	0	9,3	1	1,8	36
3	2	1	15	1	3	38
3	2	2	21	2	3	40
3	2	3	29	3	9	99
3	3	0	24	1	4	99
3	3	1	46	1	9	198
3	3	2	110	1	20	400
3	3	3	>110			

^b: ver tabla 2

Fuente: ISO 7218

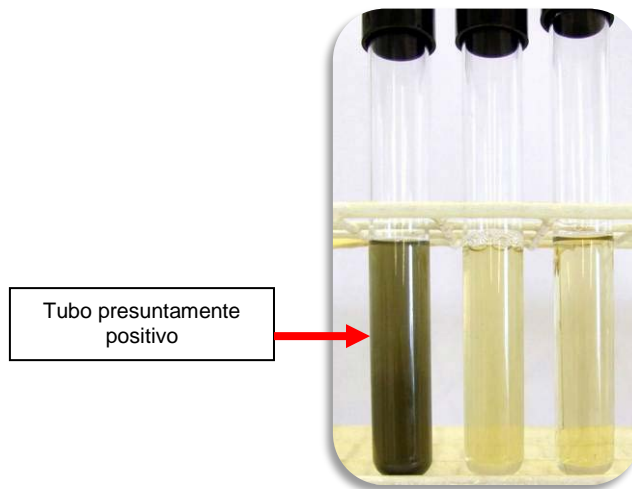
Tabla 2:

Categoría ^a	Definición
1	Cuando el número de bacterias de la muestra es igual al valor de NMP hallado, este resultado es de los que tienen mayor probabilidad de obtenerse. Como mucho, hay un 5 % de probabilidad de obtener un resultado que es menos probable que el de menor probabilidad de esta categoría
2	Cuando el número de bacterias de la muestra es igual al valor de NMP hallado, este resultado es de los que tienen una probabilidad de obtenerse menor que incluso el resultado menos probable de la categoría 1, pero hay en el mejor de los casos solamente un 1% de probabilidad de obtener un resultado que es menos probable que el de menor probabilidad de esta categoría.
3	Cuando el número de bacterias de la muestra es igual al valor de NMP hallado, este resultado es de los que tienen una probabilidad de obtenerse menor que incluso el resultado menos probable de la categoría 2, pero hay en el mejor de los casos solamente un 0.1% de probabilidad de obtener un resultado que es menos probable que el de menor probabilidad de esta categoría.
0	Cuando el número de bacterias de la muestra es igual al valor de NMP hallado, este resultado es de los que tienen una probabilidad de obtenerse menor que incluso el resultado menos probable de la categoría 3. Solamente hay un 0.1% de probabilidad de obtener un resultado de esta categoría, incluso sin que se haya cometido ninguna incorrección
^a Antes de comenzar los análisis, debería decidirse que categoría se va a aceptar, es decir, solamente la categoría 1, la 1 y la 2 o incluso la 1, la 2 y la 3. Cuando se vaya a tomar una decisión de gran importancia en base a los resultados, solamente debería aceptarse la categoría 1, o en todo caso la 1 y la 2. Los resultados de la categoría 0 deberían considerarse con un alto grado de desconfianza.	

Fuente: ISO 7218

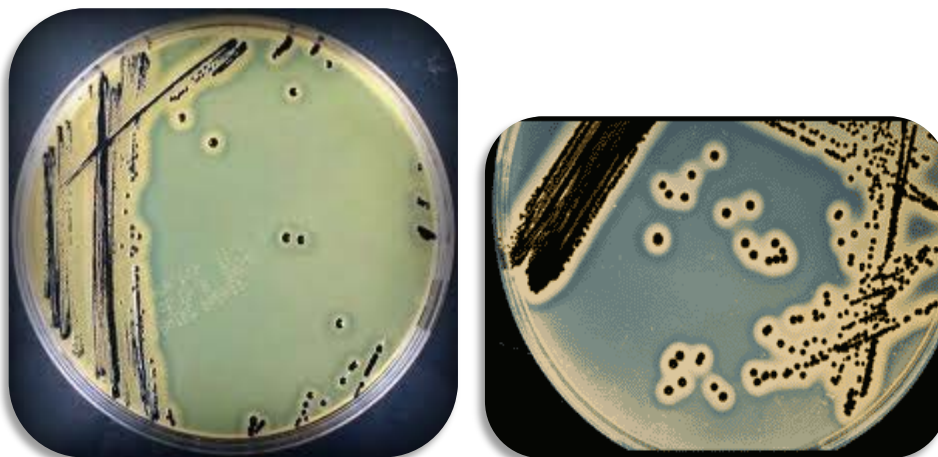
ANEXO 4: FOTOS

1. Caldo Giolitti y Cantoni



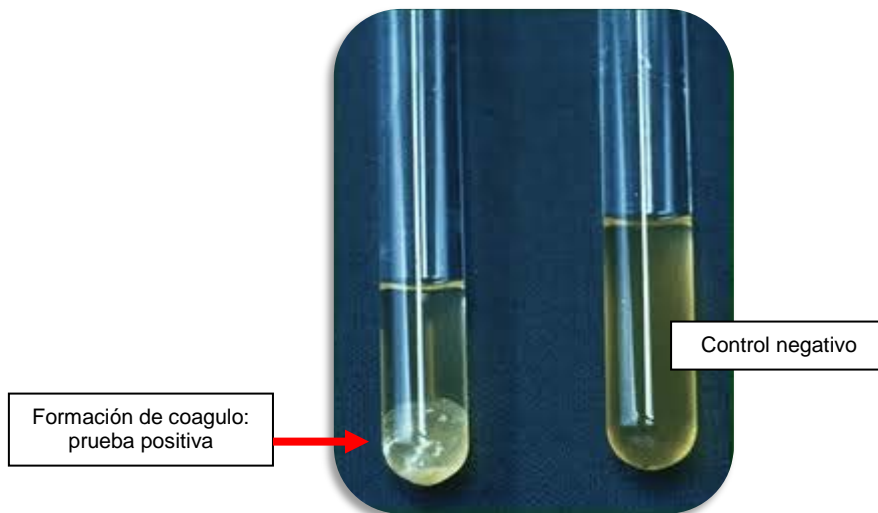
Staphylococcus aureus: Caldo Giolitti Cantoni

2. Agar Baird Parker



Staphylococcus aureus: colonias típicas negras o grises con brillo y convexas rodeadas por una zona de clarificación que puede ser parcialmente opaca. Después de una incubación de por lo menos 24 h puede aparecer un anillo opalescente de precipitación inmediatamente alrededor de la colonia.

3. Prueba de la coagulasa



Staphylococcus aureus: Prueba de la coagulasa

5. REFERENCIAS

(1) International Standard. ISO 6888 – 3. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of coagulase - positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). Part 3: Detection and MNP technique for low numbers. First edition 2003-03-15. Corrected version 2004-01-15

(2) International Standard. ISO 6887 – 1. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. First edition, 1999-02-15.

(3) International Standard. ISO 7218: 2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs. General requirements and guidance for microbiological examinations. Third edition, 2007-08-15.

NOTA: Las siguientes normas de referencias son indispensables para la aplicación del presente procedimiento. Para cada norma de referencia debe aplicarse la edición citada, en caso de no especificarse la misma, deberá aplicarse la última edición (incluyendo cualquier modificación).

ISO 6887-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

ISO 6887-2, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products

ISO 6887-3, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products

ISO 6887-4, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products meat and meat products, and fish and fishery products

ISO 7218, Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations.

ISO 6887-5, Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products

ISO/TS 11 33-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 1 : General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory

ISO/TS 11 133-2:2003, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media

Estafilococos coagulasa positiva

Detección y enumeración por la técnica de número más probable (NMP) en muestras de alimentos

Procedimiento según
International Commission on Microbiological Specifications for Foods
(ICMSF), Método 5

Nota: Este procedimiento es equivalente al procedimiento según la ISO 6888-3

Con las siguientes salvedades:

1. En el punto 3.5.2.2.2. Inoculación: pipetear volúmenes de 1 ml de cada una de las tres diluciones decimales (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) en tubos de caldo Giolitti y Cantoni (3 tubos por dilución).
2. En el punto 3.5.2.2.3. Incubación: Incubar los tubos durante 24 h - 48 h a 35°C – 37°C . La presencia de *S. aureus* se pone de manifiesto por la aparición de un precipitado negro o por el ennegrecimiento del medio.
3. En el punto 3.5.2.2.4. Siembra de los tubos. Utilizando pipetas Pasteur estériles, tomar algunas gotas del fondo de cada tubo y extenderlas sobre la superficie de placas de Petri independiente conteniendo agar Baird Parker.
4. En el punto 3.5.2.2.5. Incubación de las placas: incubar las placas en posición invertida a 35°C – 37°C durante 24 h.
5. En el punto 3.5.5.2.3. Cálculo y expresión de resultados: Calcular el NMP de *S.aureus* presentes en el alimento teniendo en cuenta el número de placas de cada dilución que contienen estafilococos positivos y utilizando la tabla 1.

Para la selección de tubos elegir la dilución más alta en la que sean positivos los 3 tubos y las dos diluciones superiores más próximas. Por ejemplo, si la dilución más alta en la que aparecen los tres tubos positivos es la 1:100 y en la 1:1000 hay un tubo positivo y en la 1:10000 ninguno, el resultado se anotaría del siguiente modo: dilución 1:100 = 3, dilución 1:1000 = 1 y dilución 1:10000 = 0. Estos resultados corresponden a la tabla de NMP para series de 3 tubos a un NMP de 400. Si no hubiera ninguna dilución que presentase los 3 tubos positivos, seleccionar las 3 diluciones más altas con algún tubo positivo. Por ejemplo, si las cuatro últimas diluciones con algún tubo positivo fueran 1:10, 1:100, 1:1000, y 1:10000 con 2, 2, 1 y 1 tubos positivos, respectivamente, los resultados se anotan como 1:100 = 2,

1:1000 = 1 y 1:1000 = 1. Este resultado corresponde en la tabla de NMP a 200.

Cuando no se hayan hecho diluciones más altas, de forma que la última presente también los tres tubos positivos, seleccionar las últimas 3 diluciones realizadas. Por ejemplo si las tres últimas diluciones fueran 1:100, 1:1000 y 1:10000 y el número de tubos positivos fuera 3, 3 y 3., respectivamente, los resultados se anotarían como 1:100 = 3, 1:1000 = 3 y 1:10000 = 3. En este caso el NMP es igual o mayor de 11000.

Tabla 1: Índices de NMP y límites de confianza (99% y 95%) cuando se utilizan tres porciones analíticas de 0.1g (ml), tres de 0.01g (ml) y tres de 0.001 g (ml)

Número más probable (NMP) de bacterias; tres tubos por cada dilución^b

Número de tubos positivos en cada dilución			NMP por gramo	Límites de confianza			
Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻²	Dilución 10 ⁻³		99%		95%	
0	1	0	3	<1	23	<1	17
1	0	0	4	<1	28	1	21
1	0	1	7	1	35	2	27
1	1	0	7	1	36	2	28
1	2	0	11	2	44	4	35
2	0	0	9	1	50	2	38
2	0	1	14	3	62	5	48
2	1	0	15	3	65	5	50
2	1	1	20	5	77	8	61
2	2	0	21	5	80	8	63
3	0	0	23	4	177	7	129
3	0	1	40	10	230	10	180
3	1	0	40	10	290	20	210
3	1	1	70	20	370	20	280
3	2	0	90	20	520	30	390
3	2	1	150	30	660	50	510
3	2	2	210	50	820	80	640
3	3	0	200	<100	1900	100	1400
3	3	1	500	100	3200	200	2400
3	3	2	1100	200	6400	300	4800

a Calculada a partir de los datos de MAN (1975).

b De cada dilución se inoculan tres tubos de medio, cada uno con 1 ml. Para calcular el NMP de diluciones mayores que las que figuran en la Tabla, multiplicar el NMP por el factor adecuado: 10, 100, 1000, etc. Por ejemplo, si los tubos seleccionados corresponden a las diluciones 10⁻², 10⁻³ y 10⁻⁴, multiplicar por 10; si las diluciones son 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵, multiplicar por 100.

Fuente: Microorganismos de los Alimentos 1. Técnicas de análisis microbiológico. ICMSF. Segunda edición.



www.anmat.gov.ar



